

**Screening-Strategien für mikrobielle Hochleistungsstämme
am Beispiel der 1,3-Propandiol-Produktion aus Rohglycerin**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Anne Katrin Ringel
aus Hamburg

1. Referent:	Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop
2. Referent:	apl. Professor Dr. Siegmund Lang
eingereicht am:	19.12.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	13.07.2012

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ringel AK, Wilkens E, Hortig D, Willke T & Vorlop KD (2012) An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (3):1049-1056

Wilkens E, Ringel AK, Hortig D, Willke T & Vorlop KD (2012) High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (3):1057-1063

Tagungsbeiträge

Ringel AK, Mildner E, Willke T & Vorlop KD. Fermentative Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerin. (Vortrag) ProcessNet-Jahrestagung und 27. Jahrestagung der Biotechnologen, Mannheim (2009)

Mildner E, Ringel AK, Böttcher D, Ast C, Willke T & Vorlop KD. Kostenreduktion der mikrobiellen 1,3-Propandiolbildung durch Medienoptimierung. (Poster) ProcessNet-Jahrestagung und 28. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen (2010)

Ringel AK, Mildner E, Willke T, Böttcher D, Schubert M & Vorlop KD. An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations. (Poster) 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini (2010)

Mildner E, Ringel AK, Willke T & Vorlop KD. Identification of cost drivers and subsequent economic optimisation of 1,3-propanediol production. (Poster) 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini (2010)

1 Einleitung und Zielsetzung 1**2 Theoretische Grundlagen 3**

2.1 Screening nach Wildtyp Mikroorganismen.....	3
2.1.1 Screening Programme nach natürlichen Mikroorganismen.....	3
2.1.2 Probenmaterial	4
2.1.3 Anreicherungsmedium.....	5
2.1.4 Primäres Screening: Anreicherung und Isolierung	5
2.1.5 Sekundäres Screening: Evaluierung der Isolate	7
2.1.6 Identifizierung	8
2.2 Glycerin.....	11
2.2.1 Eigenschaften.....	11
2.2.2 Rohglycerin aus der Biodiesel-Produktion	12
2.2.3 Wirtschaftliche Entwicklung und rechtliche Lage	14
2.2.4 Anwendungsgebiete	16
1,3-Propandiol.....	18
2.2.5 Eigenschaften.....	18
2.2.6 Chemische Herstellung	19
2.2.7 Mikrobielle Herstellung	20
2.2.8 Anwendungsgebiete	24
2.3 Screening nach 1,3-Propandiol-bildenden Mikroorganismen.....	26
2.3.1 Geschäftspotenzial und Patentlage	26
2.3.2 In der Literatur beschriebene Screening-Verfahren	27
2.3.3 Taxonomische Gruppen mit 1,3-Propandiol-Produzenten	30

3 Material und Methoden 33

3.1 Lösungen und Kultivierungsmedien.....	33
3.1.1 Spurenelementlösung.....	33
3.1.2 Mineralsalzmedium.....	33
3.1.3 Vitaminlösung DSMZ 141	35
3.1.4 Rohglycerin-Chargen.....	35
3.1.5 Ersatz komplexer Medienbestandteile	37
3.1.6 Zusammensetzung der Screening-Medien	37
3.1.7 MacConkey-Nähragar	41
3.1.8 PYX-Medium	41
3.2 Methoden der Kultivierung.....	42

3.2.1 Kultivierung auf Festmedium	42
3.2.2 Kultivierung in Hungate-Röhrchen	42
3.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben	43
3.2.4 Kultivierung in der 96-Deep-Well-Platte	43
3.2.5 Herstellung von Dauerkulturen	46
3.3 Analytische Methoden	46
3.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	46
3.3.2 Bestimmung des pH-Wertes	48
3.3.3 Kolorimetrische 3-Hydroxypropionaldehyd-Bestimmung	49
3.4 Charakterisierung und Identifizierung der Mikroorganismen	49
3.4.1 Mikroskopische Untersuchung	49
3.4.2 Bestimmung des Gram-Verhaltens	50
3.4.3 Oxidase-Nachweis	50
3.4.4 Wachstum auf MacConkey-Nähragar	50
3.4.5 Identifizierung mittels BD BBL Enterotube II	51
3.4.6 Stoffwechselphysiologische Identifizierung	52
3.4.7 Analyse der 16S rDNA	54
3.5 Probenherkunft und Probeneinsatz	54
4 Ergebnisse und Diskussion	56
4.1 Konventionelles Screening nach 1,3-Propandiol-bildenden Bakterienstämmen	56
4.1.1 Anreicherungsstrategie	56
4.1.2 Vereinzelung, Isolierung und Charakterisierung	60
4.1.3 Evaluierung der Produktionseigenschaften und Charakterisierung der Isolate	61
4.1.4 Zusammenfassung – Konventionelles Screening-Verfahren	64
4.2 Implementierung einer Hochdurchsatz-Strategie in der Evaluierungsphase	65
4.2.1 Variation des pH-Puffersystems	65
4.2.2 Scale-down für den Einsatz in 96-Deep-Well-Platten	71
4.2.3 Zusammenfassung – Optimierung der Evaluierungsphase	78
4.3 Variation der Anreicherungsstrategie	79
4.3.1 Screening 2 – Optimierung des Anreicherungsmediums	80
4.3.2 Screening 3a – Anreicherung im Mikromaßstab	84
4.3.3 Screening 3b – Variation der Sauerstoffbedingungen	89
4.3.4 Screening 4 – Gruppierte Anreicherungskultur	92
4.3.5 Zusammenfassung – Variation der Anreicherungsphase	95

4.4 Optimierung der Aufreinigung - Kolonie-Evaluierung im Mikromaßstab	97
4.4.1 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 2	98
4.4.2 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 3a	100
4.4.3 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 3b	101
4.4.4 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 4	106
4.4.5 Zusammenfassung – Kolonie-Evaluierung	109
4.5 Evaluierung der Reinkulturen	110
4.5.1 Reinkulturen des Screening-Durchgangs 2	111
4.5.2 Reinkulturen des Screening-Durchgangs 3	119
4.5.3 Reinkulturen des Screening-Durchgangs 4	128
4.5.4 Zusammenfassung – Evaluierung der Reinkulturen.....	136
4.6 Identifizierung der potenziellen Produktionsstämme.....	138
4.7 Vergleich und Beurteilung der Screening-Verfahren.....	144
5 Zusammenfassung	151
6 Ausblick.....	153
7 Anhang	155
7.1 Chemikalien	155
7.2 Geräte und Materialien.....	156
7.3 Herkunft der Umweltproben.....	158
7.4 Kalibrierungen	160
7.5 Abbildungsverzeichnis.....	161
7.6 Tabellenverzeichnis.....	165
8 Literaturverzeichnis.....	168

Symbole und Abkürzungen

Bezeichnung	Bedeutung
AGEE-Stat	Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik
c [g/L]	Konzentration
Δc [g/L]	Konzentrationsänderung
CoA	Coenzym A
3-HPA	3-Hydroxipropionaldehyd
a	Jahr
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
<i>C. b.</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CNCM	Collection Nationale De Cultures De Microorganismes
d	Tag
DNA	Desoxyribonukelinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DWP	96-Deep-Well-Platte
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
E'_o [mV]	Redoxpotenzial unter Standardbedingungen
E_h [mV]	Redoxpotenzial des Systems
FD	free delivered
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.
g [m/s ²]	Erdbescheunigung
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HE	Hefeextrakt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICIS	International Chemical Information Service
ICT	Institut für Chemische Technologie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
min	Minute
Mio.	Millionen
MONG	matter organic non glycerol
MRS	de <u>Man</u> , <u>Rogosa</u> und <u>Sharpe</u>
MS	Massenspektrometrie
MSM	Mineralsalzmedium
n. b.	nicht bewachsen
n. g.	nicht getestet
NK	Negativkontrolle
NAD / NADH ₂	Nicotinsäureamidadenindinukleotid
NADP / NADPH ₂	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat

Bezeichnung	Bedeutung
NMR	Kernresonanzspektrometrie
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
PG	Pharmaglycerin
ppm	parts per million, mg je kg
PBT	Polybutylenterephthalat
PET	Polyethylenterephthalat
pKs	Säurekonstante, dekadischer Logarithmus
PTI	Polytrimethylenisophthalat
PTN	Polytrimethylenaphthalat
PTT	Polytrimethylenterephthalat
PYX	<u>P</u> eptone, <u>Y</u> east extract, <u>X</u> = variables Substrat
1,3-PD	1,3-Propandiol
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RG	Rohglycerin
RI	Refraction Index, Brechungsindex
S	Svedberg
SL	Spurenelementelösung
ssp.	subspezies
t	Tonne
T [°C]	Temperatur
TRBA	Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe
TS	Typstamm
UFOP	Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e. V.
UV	Ultraviolettstrahlung
upm	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
VL	Vitaminlösung
VPI	Virginia Polytechnical Institute
vTI	Johann Heinrich von Thünen Institut
w	Gewicht
X	Substrat

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Vorkommen fossiler Rohstoffe sind begrenzt und die Weltproduktion von Erdöl, Kohle und Erdgas wird bis zur Mitte dieses Jahrhunderts ihren Höhepunkt erreichen (Li, 2011). Eine alternative Quelle organischer Kohlenstoffverbindungen sind nicht zur Nahrungsgewinnung verwendete land- und forstwirtschaftlich erzeugte Produkte - nachwachsende Rohstoffe (Trösch et al., 2009). Neben der energetischen ist vor allem deren stoffliche Nutzung interessant, da die Gewinnung regenerativer Chemikalien die Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen verringert und Kohlendioxid bindet (Haas und Skerra, 2008). Im Jahr 2001 wurden ca. 2,5 % der Produkte der chemischen Industrie auf biotechnischem Weg hergestellt, bis 2020 ist ein Anstieg auf bis zu 10 % prognostiziert (Rhein et al., 2011).

Durch die Anwendung biotechnischer Methoden in industriellen Produktionsprozessen (Weiße Biotechnologie) können eine Reihe von Plattformchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden. Glycerin wird als einer der wichtigsten Ausgangsstoffe erachtet, da es in großen Mengen als Nebenprodukt bei der Herstellung von Biodiesel aus Pflanzenölen anfällt (Werpy et al., 2004). Durch das rasante Wachstum des Biodiesel-Weltmarktes kam es in den letzten Jahren zu einem Überschuss an Glycerin und damit zu einem stetigen Preisverfall (Yazdani und Gonzalez, 2007). Nicht aufgearbeitetes Glycerin, das direkt aus dem Biodiesel-Prozess stammt, wird als Rohglycerin bezeichnet. Es enthält Wasser und Verunreinigungen wie Methanol, Fettsäuren, Katalysatorsalze und organische Rückstände. Die Aufreinigung zu Pharmaglycerin ist mit hohen Kosten verbunden (Willke und Vorlop, 2008). Der direkte Einsatz des Rohglycerins als kostengünstiges Fermentationssubstrat für die biotechnische Produktion hochwertiger Chemikalien könnte allerdings den Biodiesel-Prozess insgesamt wirtschaftlicher machen (Johnson und Taconi, 2007).

Bei der biotechnischen Umsetzung des Glycerins durch Mikroorganismen entstehen eine Reihe interessanter Fermentationsprodukte wie Ethanol, organische Säuren (z. B. Milch-, Propion- oder Bernsteinsäure) und 1,3-Propandiol (Choi, 2008). Die biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol, ein Baustein in der großtechnischen Herstellung von Polytrimethylenterephthalat (PTT), steht hierbei im Fokus (Yazdani und Gonzalez, 2007).

Als Quelle geeigneter Produktionsstämme können Mikroorganismen aus Stammsammlungen dienen. Unter den Wildtyp Stämmen werden *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium butyricum* derzeit als die aussichtsreichsten 1,3-Propandiol-Produzenten für einen industriellen Prozess angesehen, da sie hohe Produktivitäten, Produktkonzentrationen und Ausbeuten erreichen (Saxena et al., 2009).

Probleme beim Einsatz dieser Stämme im großtechnischen Maßstab werden jedoch durch Faktoren wie Pathogenität, anaerobe Kultivierungsbedingungen und die Notwendigkeit einer Supplementation mit nährstoffreichen, komplexen Medienbestandteilen verursacht (Yazdani

und Gonzalez, 2007). Zudem hemmen Verunreinigen im Rohglycerin das Wachstum vieler Mikroorganismen (Mantzouridou et al., 2008; Pyle et al., 2008; Moon et al., 2009).

Eine weitere Quelle für Produktionsstämme ist die Isolierung natürlicher Produzenten aus der Umwelt. Eine maßgeschneiderte Screening-Strategie ermöglicht die gezielte Isolierung von Stämmen mit sehr guten Produktionseigenschaften, wie hohe Produktivität, Endkonzentration, Ausbeute und Toleranz gegenüber den im Rohglycerin enthaltenen Verunreinigungen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer solchen maßgeschneiderten Strategie zum Screening nach Hochleistungsstämmen für die biotechnische Produktion anaerober Stoffwechselprodukte aus Rohglycerin. Die Entwicklung der Strategien wurde exemplarisch am Screening nach 1,3-Propandiol-Produzenten dargestellt.

Hierzu sollte zunächst das in der Literatur beschriebene, konventionelle Screening-Verfahren beurteilt werden. Die Phasen der Anreicherung, Isolierung und der Evaluierung der Produktionsstämme sollten anschließend optimiert werden. Im Fokus standen die Erhöhung des Durchsatzes an Umweltproben und die Entwicklung einer hochselektiven Anreicherungsstrategie. Wichtige Stammanforderungen sind hierbei:

- Hohe 1,3-Propandiol-Toleranz
- Hohe Rohglycerin-Toleranz
- Geringer Bedarf an Supplinen
- Risikogruppe 1 Mikroorganismus

Im Anschluss an das Screening sollten die Reinkulturen auf ihre Produktionseigenschaften untersucht werden, um eine fundierte Empfehlung potenzieller Produktionsstämme für die zeit- und kostenintensive Fermentationsoptimierung im Bioreaktor zu treffen. Für diese Evaluierung sollte eine effiziente Hochdurchsatz-Strategie implementiert werden.

Die entwickelten Screening-Verfahren sollten eine einfache Anpassung an Rohglycerin eines bestimmten Herstellungsprozesses und an verschiedene Supplin-Quellen erlauben, um flexibel auf die Anforderungen des Produktionsprozesses reagieren zu können. Grundsätzlich sollte die Anwendung der Screening-Strategie in einem Robotersystem möglich sein.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Screening nach Wildtyp Mikroorganismen

2.1.1 Screening Programme nach natürlichen Mikroorganismen

Die Entwicklung einer Screening-Strategie beginnt mit der Definition der gewünschten Produkt-Aktivität und einer Analyse des Geschäftspotenzials sowie der Patentsituation des Produktes. Industrielle Screening-Programme nach natürlichen Mikroorganismen verlaufen prinzipiell nach dem in Abbildung 2.1 dargestellten Schema

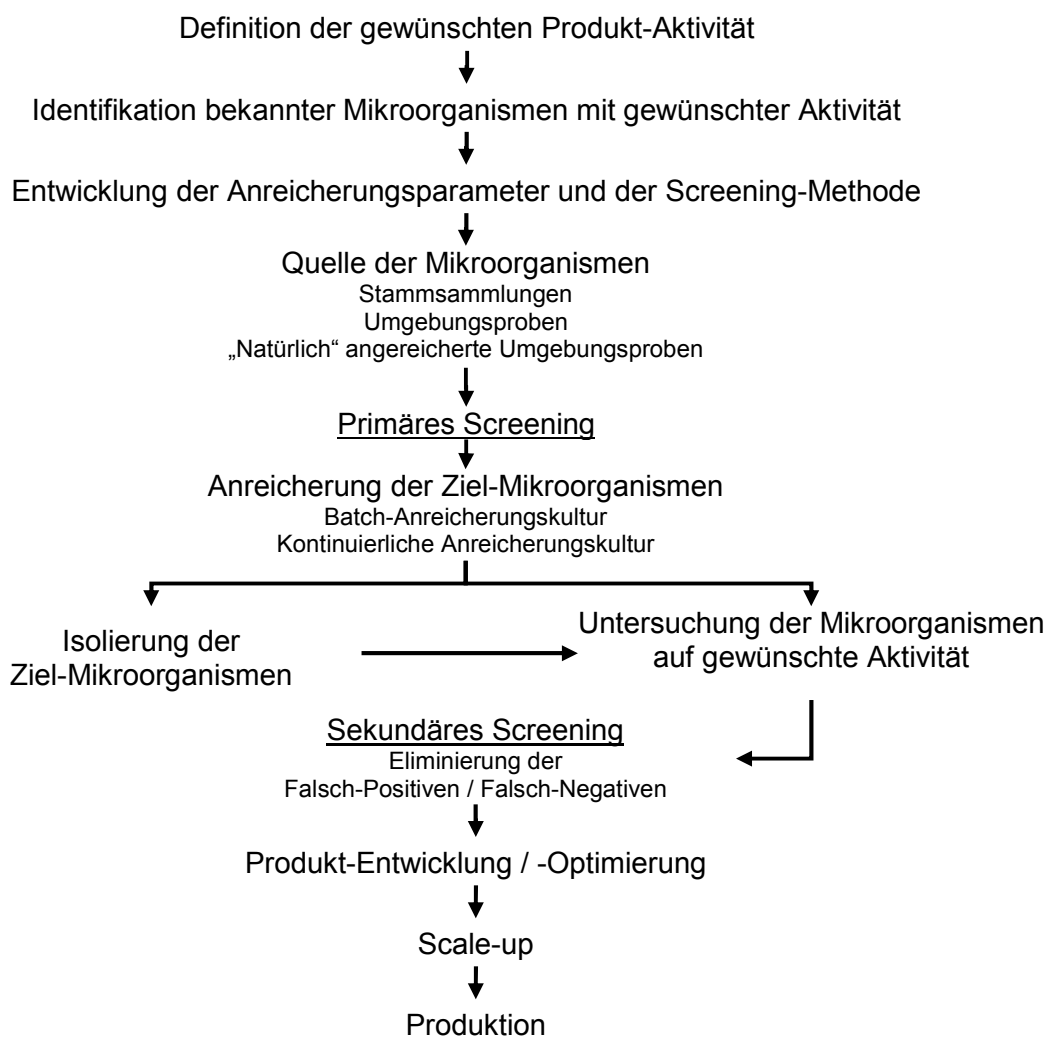


Abbildung 2.1: Allgemeines Schema eines industriellen Screening-Programms (modifiziert nach Steele und Stowers (1991))

In der ersten Phase, dem primären Screening, wird zunächst ein Pool an Mikroorganismen mit der gewünschten Aktivität isoliert, welche dann in einem nächsten Schritt, dem sekundären Screening, beurteilt wird. Ziel ist es, möglichst schnell Biokatalysatoren zu gewinnen, die den Anforderungen des Screenings optimal entsprechen.

2.1.2 Probenmaterial

Die Isolierung aus natürlichen Umweltproben ist, neben Mikroorganismen aus Stammsammlungen, eine wichtige Quelle wirtschaftlich nutzbarer Bakterienstämme. In Umweltproben liegen Mischpopulationen, bestehend aus vielen verschiedenen Spezies an Mikroorganismen, vor. Für eine Anwendung im industriellen Maßstab sind aber meist einheitliche Populationen bzw. Reinkulturen gewünscht (Bast, 2001).

Das Ausmaß der mikrobiellen Diversität in der Natur ist nicht genau bekannt. Die Anzahl der existierenden prokaryotischen Spezies wird auf 2-3 Mio. geschätzt (Antranikian und Schäfer, 2006). Die Herkunft der Proben hat Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, pathogene Isolate zu erhalten. Bei Proben aus Böden, Gewässern / Sedimenten, Luft, Pflanzen und kaltblütigen Tieren ist die Wahrscheinlichkeit gering, eine mittlere Wahrscheinlichkeit besteht bei Proben aus Abwasser, Mist und warmblütigen Tieren. Bei menschlichen Blut- oder Gewebeproben ist die Wahrscheinlichkeit dagegen hoch (Lelieveld et al., 1995).

Umweltproben können ungezielt genommen werden oder gezielt an Standorten, an denen bereits über einen längeren Zeitraum eine mikrobielle Anreicherung stattgefunden hat, wie z. B. bei der Abwasserbehandlung, in Abfallströmen von Obst- und Gemüse-verarbeitenden Betrieben etc. Zudem ist es sinnvoll, Standorte zu wählen, an denen zusätzlich natürliche Selektion stattgefunden hat, wie z. B. die Verwertung des Zielsubstrates oder Hemmung der Konkurrenz-Organismen (Steele und Stowers, 1991). Um eine größere genetische Variabilität zu erhalten, besteht die Möglichkeit, bisher wenig erforschte Umgebungen wie extreme Habitate zu untersuchen (Clarkson et al., 2000).

Bei der Probeentnahme sind mehrere Faktoren zu beachten. Die physikochemischen Standortbedingungen (z. B. Sauerstoffgehalt, Temperatur, Jahreszeit etc.) sollten den Bedingungen der späteren Anreicherungskultur bzw. den gewünschten Stammeigenschaften entsprechen. Im Anschluss an die Probenahme sollte das Material schnell verwendet werden, da es sonst zu Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung, z. B. den Verlust der Lebensfähigkeit vegetativer Zellen, kommt (Bull et al., 1992; Bull et al., 2000).

Die Behandlung der Probe kann als Selektionsinstrument genutzt werden. Eine Behandlung mit Antibiotika kann gezielt Gruppen von Mikroorganismen ausschalten (Clarkson et al., 2000). Durch Filtration können sehr kleine Mikroorganismen abgetrennt werden. Langsame Lufttrocknung oder Hitzebehandlung bzw. Pasteurisieren verringert die Anzahl vegetativer Mikroorganismen, während Dauerformen wie Pilz- oder Endosporen weitestgehend intakt bleiben (Bast, 2001; Overmann, 2006).

Das Pasteurisieren ist eine relativ sanfte Behandlung zur Reduktion der Anzahl der lebensfähigen Zellen um 97 bis 99 %. Allerdings sind die vegetativen Zellen einiger Mikroorganismen (z. B. *Enterococcus* ssp.) hitzeresistent und können auch diese Form der Behandlung überleben (Overmann, 2006).

2.1.3 Anreicherungsmedium

Die Anreicherung wird in einem flüssigen, meist synthetischen Kultivierungsmedium durchgeführt. Das Wissen um die Nährstoffansprüche und optimalen Wachstumsbedingungen eines Produktionsstammes ist entscheidend bei der Entwicklung eines geeigneten Anreicherungsmediums. Hierbei sollten nur die minimalen Anforderungen des anzureichernden Organismus gedeckt werden. Ein Anreicherungsmedium besteht meist aus einem Mineralsalzmedium, einer Spurenelementlösung, einer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und eventuell Wachstumsfaktoren (Bast, 2001). Der Zusatz einer einzigen Kohlenstoff- und Energiequelle reichert Verwerter dieser Substanz an. Durch Einsatz von Inhibitoren kann ein bestimmter Stoffwechselweg oder eine Gruppe von Mikroorganismen blockiert werden (Steele und Stowers, 1991). Bei Anreicherung einiger Mikroorganismen ist der Zusatz bestimmter Wachstumsfaktoren, also Substanzen, die das Wachstum stimulieren, erforderlich (Auxotrophie). Meist sind es organische Stoffe, wie Aminosäuren, Purine / Pyrimidine und Vitamine, die vom Mikroorganismus nicht selbst synthetisiert werden können oder die das Wachstum erheblich beschleunigen, da sie nicht durch den Mikroorganismus *de novo* synthetisiert werden müssen. Die Wachstumsfaktoren können als reine Substanz oder in Form von komplexen Substraten wie Hefeextrakt zugegeben werden (Overmann, 2006).

Die pH-Pufferung ist bei Prozessen, bei denen organische Säuren gebildet werden, besonders wichtig. Einerseits kann sich die metabolische Aktivität der Mikroorganismen bei Abweichungen von ihrem pH-Optimum verändern (z. B. Produktion neutraler Produkte statt organischer Säuren). Andererseits sind schwache organische Säuren im sauren Milieu toxisch, da sie überwiegend in der undissoziierten Form vorliegen und somit leicht durch die bakterielle Zellmembran diffundieren. Dort vermindern sie den intrazellulären pH-Wert (Overmann, 2006). Der Einsatz von Phosphat als Puffersubstanz ist nur begrenzt möglich, da viele Mikroorganismen durch erhöhte Phosphatkonzentrationen gehemmt werden. Zudem bildet Phosphat Präzipitate mit Magnesium-, Calcium- und Eisen(III)ionen (Bast, 2001).

2.1.4 Primäres Screening: Anreicherung und Isolierung

Bei einem Screening nach natürlichen Produzenten aus Umweltproben, einem Biodiversitätsscreening, wird zunächst ermittelt, ob Mikroorganismen mit der gewünschten Aktivität bereits bekannt sind. So können Screening-Verfahren auf die metabolischen und physiologischen Anforderungen dieser taxonomischen Gruppen („high probability taxa“) ausgerichtet und Stämme mit neuen oder besseren Eigenschaften isoliert werden (Antranikian und Schäfer, 2006). Ist dies nicht der Fall, oder soll erforscht werden, ob noch weitere Mikroorganismen die gewünschte Aktivität aufweisen, so werden die gewünschten Wachstumsbedingungen eingestellt. Dies können z. B. extreme pH-Werte und Temperaturen, Substratverwertung oder Produkttoleranz sein. Das entwickelte Verfahren wird anschließend

iterativ verbessert, beispielsweise durch Optimierung des Nachweisverfahrens oder der Anreicherungsparameter (Antranikian und Schäfer, 2006).

Es wird zwischen direkter Isolierung der Mikroorganismen aus den natürlichen Proben und der Isolierung nach Anreicherung der gewünschten Mikroorganismen unterschieden.

Die direkte Isolierung kann angewendet werden, wenn die gewünschten Mikroorganismen mit großer Wahrscheinlichkeit bereits in hoher Zahl in der natürlichen Probe vorliegen (Overmann, 2006). Bei direkter Isolierung wird die natürliche Probe direkt auf differenzierendem Festmedium vereinzelt. Ein Nachweis der gewünschten Aktivität des Mikroorganismus erfolgt indirekt durch Medienveränderung im Umkreis der Kolonie. Eine enzymatische Aktivität kann eine Farbreaktion bzw. eine Klärung des Agar-Agars bewirken (Antranikian und Schäfer, 2006). Die Protonen-Suizid-Methode ist ein weiteres Beispiel. Durch Zugabe von Natriumbromid (NaBr) und Natriumbromat (NaBrO_3) zum Festmedium wird im Falle von starker Säureproduktion durch den Mikroorganismus toxisches Brom freigesetzt und Koloniebildung verhindert. Soll z. B. die Säurebildung eines bestehenden Stammes verringert werden, so kann nach der Mutagenese die Protonen-Suizid-Methode für die Selektion von Mutanten mit verringerter Säurebildung eingesetzt werden (Abbad-Andaloussi et al., 1995). Die direkte Isolierung ist schnell und einfach. Der Nachweis erfolgt qualitativ und meist relativ unspezifisch, so dass es leicht zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommt. Ist kein einfacher indirekter Nachweis möglich, so muss die Aktivität direkt durch Analyse nachgewiesen werden, wodurch sich der Aufwand stark erhöht (Steele und Stowers, 1991).

Eine andere Möglichkeit der direkten Isolierung ist die Vereinzelung der Mikroorganismen durch Verdünnung der natürlichen Probe in Flüssigmedium („extinction culture“), oft nach einer Probenaufarbeitung. Dies hat den Vorteil dass man in der Regel eine Reinkultur erhält. Die Methode ist sehr gut automatisierbar und ermöglicht die Isolierung oligotropher Mikroorganismen, die in einer konventionellen Anreicherungskultur von schnell wachsenden Stämmen überlagert würden (Bull et al., 1992; Bull et al., 2000; Singh und Pelaez, 2008).

Anreicherungskulturen mit selektiven Bedingungen ermöglichen die Unterdrückung ungewollter und die Förderung der gewünschten Mikroorganismen. So können auch Mikroorganismen isoliert werden, die in sehr geringer Zahl in einer natürlichen Probe vorliegen. Das Anreicherungsmedium soll stringente Bedingungen schaffen, um das Wachstum des gewünschten Mikroorganismus zu erlauben. Variation der Kultivierungsbedingungen, wie des pH-Wertes und der Temperatur, sind bei Isolierung extremophiler Mikroorganismen entscheidend. Auch Faktoren wie der Sauerstoffgehalt des Kulturmediums und die Lichtverhältnisse müssen berücksichtigt werden. (Bull et al., 1992). Es werden zwei Verfahrensführungen für die Anreicherungskultur angewendet: Batch- und Chemostat-Kultur. Viele Mikroorganismen lassen sich unter Batch-Bedingungen gut anreichern, weshalb diese einfache Methode sehr häufig angewendet wird (Overmann, 2006). Sie hat den Nachteil,

dass die Kultivierungsbedingungen, und damit auch die Selektionsbedingungen, im Laufe der Kultivierung variieren (pH, Substrat- und Produktkonzentration, Sauerstoffgehalt etc.). Es herrscht in der Regel Substratüberschuss, so dass Mikroorganismen mit hohen Wachstumsraten und geringer Substratspezifität bevorzugt angereichert werden (Bull et al., 1992).

Die Anreicherung unter Chemostat-Bedingungen erfolgt über eine langsame, oft mehrere Monate dauernde, graduelle Anpassung der Kultivierungsbedingungen mit einer oder mehreren das Wachstum begrenzenden Nährstoffkomponenten im Zulauf (Overmann, 2006). Die Chemostat-Anreicherung ist für die Isolierung von selten vorkommenden Mikroorganismen bzw. genetischen Mutanten mit positiven Produktionseigenschaften in einer Population geeignet (Steele und Stowers, 1991; Clarkson et al., 2000).

Ziel der Isolierung ist die Herstellung einer Reinkultur, also einer Mikroorganismen-Population die aus einer einzelnen Zelle entstanden ist. Eine solche als axenisch bezeichnete Kultur kann genetisch heterogen sein, da weiterhin Mutation und Selektion auftreten werden. Um eine axenische Kultur zu erhalten, müssen die einzelnen Zellen der Anreicherungskultur bzw. der natürlichen Probe physikalisch voneinander getrennt und in steriles Medium inokuliert werden. Dies kann entweder durch Ausstreichen auf Festmedium oder durch Verdünnung der Suspension in Flüssigmedium erfolgen („extinction culture“ s. o.) (Overmann, 2006). Die Isolierung auf Festmedium verläuft oft subjektiv, auch nach Anwendung selektiver Screening-Bedingungen. Häufig ist die Anzahl der zu trennenden Mikroorganismen sehr groß und viele sind redundant vorhanden. Besonders bei Bakterien sind die unterschiedlichen Spezies bei Wachstum auf Festmedium makroskopisch kaum auseinanderzuhalten. Um interessante Stämme nicht zu verlieren, ist demnach die Untersuchung sehr vieler Isolate notwendig. Ein Robotersystem mit Kolonie-Pick-Funktion kann diesen Schritt erheblich vereinfachen (Clarkson et al., 2000).

2.1.5 Sekundäres Screening: Evaluierung der Isolate

An die Isolierung der Stämme im eigentlichen (primären) Screening schließt sich in der Regel ein sekundäres Screening unter selektiveren Bedingungen an. Hierdurch werden einerseits die falsch-positiven Stämme eliminiert und andererseits eine Beurteilung der Isolate hinsichtlich der Produktionseigenschaften erlaubt. So kann eine Stammauswahl für die Durchführung der arbeits- und materialintensiven Schritte Fermentationsoptimierung und Scale-up getroffen werden.

Während der Nachweis der Produkt-Aktivität (z. B. Bildung des Endproduktes) im primären Screening oft qualitativ und indirekt erfolgte, ist im sekundären Screening ein direkter Nachweis notwendig. Die eingesetzte Analytik muss quantitativ, selektiv und empfindlich sein. Beispiele für Nachweisverfahren sind Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC),

Gas Chromatographie (GC), Kernresonanzspektroskopie (NMR) oder Massenspektrometrie (MS) (Steele und Stowers, 1991).

Im sekundären Screening wird die Qualität des primären Screenings deutlich. Besitzen die Isolate die definierte Produkt-Aktivität und erfüllen die Stammanforderungen oder muss die Strategie überdacht werden. Zum Abschluss des sekundären Screenings werden die positiv evaluierten Stämme ausgewählt und die Ergebnisse im größeren Maßstab überprüft.

2.1.6 Identifizierung

Die Beurteilung der Isolate hinsichtlich des Potenzials als Produktionsstamm erfordert eine genaue Identifikation. Dabei ist die Risikogruppe eines Isolates von entscheidender Bedeutung für die sichere Handhabung im Labormaßstab und die Sicherheitsanforderungen einer industriellen Großanlage. Die Kenntnis der Identität ermöglicht die optimale Anpassung der Kultivierungsbedingungen für die weitere Evaluierung im Bioreaktormaßstab. Es ist demnach wichtig, die aus einem Screening resultierenden Mikroorganismen schnell und eindeutig zu identifizieren. Hierbei kommen sowohl klassische phänotypische als auch genotypische Charakterisierungsarten zum Einsatz.

2.1.6.1 Phänotypische Charakterisierung

Die Phänotypische Charakterisierung basiert zum einen auf der Untersuchung der morphologischen Eigenschaften des Isolates. Die Zellmorphologie (Zellform, -größe und charakteristische Wuchsformen), Sporenbildung (Art, Lokalisierung und Größe), Begeißelung und Beweglichkeit, die intrazellulären Strukturen, Koloniemorphologie (Form, Größe, Beschaffenheit und Pigmentbildung), sowie Gram-Färbeverfahren werden untersucht (Tindall et al., 2010).

Zum anderen werden auch physiologische und biochemische Merkmale des Isolates untersucht. Basierend auf dem Vergleich struktureller Elemente der Zelle, wie der Zellwand, der Membran und Bestandteilen des Zytoplasmas, ist eine chemotaxonomische Charakterisierung möglich (Tindall et al., 2010).

Die Identifizierung der Isolate erfolgt oft durch Wachstum auf differenzierenden und selektiven Kultivierungsmedien. In der Vergangenheit erfolgte die taxonomische Einordnung neuer Isolate ausschließlich über phänotypische Merkmale. Gerade bei der Bestimmung klinischer Isolate war eine schnelle und sichere Identifizierung wichtig (O'Hara, 2005). Um Zeit- und Arbeitsaufwand gering zu halten führte dies zur Entwicklung einer Reihe kommerziell erhältlicher Testsysteme, in denen die Testmedien im kleinen Maßstab angeordnet sind und parallel aus demselben Inokulum beimpft werden können. Im Anschluss an die Auswertung der Tests erfolgt ein Vergleich mit einer entsprechenden Datenbank oder einem Codebuch

(Brock et al., 2000). Beispiele für manuelle, kommerzielle Testsystemen zur Identifikation von *Enterobacteriaceae* und anaeroben Bakterien sind in Tabelle 2.1 gegeben.

Tabelle 2.1: Kommerziell erhältliche Testsysteme für die phänotypische Identifizierung von Bakterien

Produkt-bezeichnung	Hersteller	Ziel-organismen	Inkubation [h]	Referenz
API 20 A	bioMérieux, Frankreich	Anaerobe	24	(Lindstrom et al., 1999)
Rapid ID 32 A		Anaerobe	4	(Sperner et al., 1999)
API 20 E		Gram-negative	18-24	(O'Hara, 2005)
RapiD 20 E		Gram-negative	4	(O'Hara, 2005)
BBL Enterotube II	Becton Dickinson, USA	<i>Enterobacteriaceae</i>	18-24	(O'Hara, 2005)
BBL Crystal ANR ID		Anaerobe	4	(Blairon et al., 2010)
RapiD ANA II	Oxoid, Großbritannien	Anaerobe	4-5	(Lindstrom et al., 1999)
Microbact		Gram-negative	18-24	(O'Hara, 2005)

Den Vorteilen dieser Testsysteme stehen Nachteile gegenüber. So muss die verwendete Datenbank aktuell und vollständig sein. Diese sind oftmals stark auf klinische Isolate ausgelegt. Auch die Instabilität der phänotypischen Merkmale und ihre starke Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen sind problematisch. Zudem reflektiert die phänotypische Identifizierung nur unzureichend die genetische Komplexität des Organismus (Janda und Abbott, 2002). Zusätzlich gibt es Probleme bei der Identifikation von Bakteriengruppen, die wenig positive Testergebnisse liefern wie z. B. Clostridien bei den biochemischen Testmethoden (Sperner et al., 1999; Mory et al., 2009).

2.1.6.2 Genotypische Charakterisierung

Es existieren eine Reihe DNA-basierter Methoden zur Zuordnung eines Isolates zu bestehenden Spezies bzw. zur Beschreibung einer neuen Spezies. So ist der G+C-Gehalt der DNA charakteristisch, für eine nahverwandte Gruppe sehr ähnlich und wichtig für die Bestimmung der DNA-Schmelztemperatur. Weitere Möglichkeiten sind DNA-DNA oder DNA-RNA-Hybridisierungs-Techniken. Diese stellen einen indirekten Vergleich der Sequenzen zweier Arten dar (Tindall et al., 2010).

Zur Aufklärung der Entwicklung und Abstammung von Spezies eignen sich besonders gut Housekeeping Gene, da deren Produkte in allen Bakterien für den Zellerhalt grundsätzlich notwendig und somit sehr gut konserviert sind (Janda und Abbott, 2006). Diese Moleküle sind phylogenetische Chronometer. Durch Analyse und Vergleich der DNA-Sequenz zweier Arten kann der phylogenetische Abstand ermittelt werden, da die Zahl der Sequenzunterschiede der Zahl an stabilen Mutationen proportional ist, die seit der Abspaltung von einem gemeinsamen Vorfahren stattgefunden haben (Brock et al., 2000). Die Untersuchung des 16S rRNA Gens, welches den RNA-Anteil der kleinen Untereinheit des bakteriellen Ribo-

soms kodiert, wird routinemäßig für die Erforschung der bakteriellen Phylogenie und Taxonomie eingesetzt. (Dhalluin et al., 2003; Tindall et al., 2010). Das 16S rRNA Gen eignet sich hierfür besonders gut, da es in allen Bakterien existiert und die Funktion des Gens sich im Laufe der Zeit nicht verändert hat. Zudem ist das Gen mit ca. 1500 Basenpaaren groß genug, um statistisch relevante Sequenzinformationen zu enthalten (Patel, 2001). Die Sequenz eines untersuchten Abschnitts wird mit den Sequenzen einer Datenbank verglichen. Diese Datenbanken sind entweder kommerziell oder öffentlich im Internet zugänglich. Grundsätzlich ist die Güte der Identifikation abhängig von der verwendeten Gen-Datenbank, z. B. der Anzahl der hinterlegten Sequenzen und dem Vorhandensein von falschen Sequenzen (Patel, 2001; Mignard und Flandrois, 2006).

Die Auflösung der 16S rDNA Sequenzierung ist auf Spezies-Ebene gering. Ribosomale Gene sind stark konserviert, so dass die Unterschiede zwischen zwei Spezies des gleichen Genus oft sehr klein sind (Janda und Abbott, 2002). Ein neu isolierter Stamm kann nicht eindeutig zugeordnet werden, wenn er sehr nah mit zwei unterschiedlichen Spezies verwandt ist oder nur wenige ähnliche Sequenzen in einer Datenbank hinterlegt sind. Ebenfalls kommt es zu Problemen, wenn mehr als eine DNA-Gruppe als Spezies zusammengefasst wurde, weil die Spezies sich phänotypisch gleich verhalten (Phänospezies) oder wenn der Typstamm genetisch nicht repräsentativ für seine Spezies ist, da er vor Einführung genetischer Untersuchungen festgelegt wurde (Janda und Abbott, 2002; Janda und Abbott, 2007). Liegt die größte Ähnlichkeit eines Isolates zu einer anderen Spezies bei weniger als 97 %, ist es wahrscheinlich, dass eine neue Spezies vorliegt. Eine höhere Ähnlichkeit schließt dies jedoch nicht aus. Für eine genaue Aussage müssen weitere Identifikationsmethoden hinzugezogen werden. Hier werden vor allem DNA-DNA-Hybridisierung, oder die Analyse einer Gensequenz mit höherer Auflösung und phänotypische Charakterisierung angewendet (Fox et al., 1992; Stackebrandt und Goebel, 1994; Tindall et al., 2010).

2.1.6.3 Sicherheitseinstufung natürlicher und genetisch veränderter Mikroorganismen

Mikroorganismen werden im Rahmen des Arbeitsschutzes in Abhängigkeit von ihrem Gefährdungspotenzial für Mensch und Umwelt in die Risikogruppen 1 bis 4 eingeordnet (EU-Richtlinie 2000/54/EG (2000) bzw. Biostoffverordnung (1999)). Für die Einordnung in die Risikogruppen sind die Pathogenität, die Virulenz, die infektiöse Dosis, der Infektionsweg und die Häufigkeit der Erkrankungen in der Bevölkerung ausschlaggebend. Die Zuordnung natürlicher Mikroorganismen zu den Risikogruppen wird nach dem Stand des Wissens regelmäßig aktualisiert, sie ist somit einem stetigem Wandel unterworfen.

Die Einordnung genetisch veränderter Mikroorganismen in Risikogruppen erfolgt nach dem Gentechnikgesetz (1990) und der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (1990). Die Einordnung

der Stämme hängt u. a. von den Risikogruppen der Spender- und Empfängerorganismen, der Anwesenheit von Resistenzgenen, der Beweglichkeit und der Pathogenität im Vergleich zum Empfängerorganismus ab.

Bewährte, in traditionellen Prozessen eingesetzte, Mikroorganismen sind der Risikogruppe 1 zugeordnet, so dass auch bei Einsatz im industriellen Maßstab nur minimale Sicherheitsmaßnahmen, wie die allgemeinen Hygienemaßnahmen (TRBA 500) und die Grundregeln guter mikrobiologischer Technik (TRBA 100), einzuhalten sind.

Pathogene Mikroorganismen (Risikogruppe 2 bis 4) und die meisten genetisch veränderten Mikroorganismen erfordern hingegen ein höheres Maß an Eindämmung und Sterilität. Abhängig von der Risikogruppe des verwendeten Mikroorganismus werden unterschiedliche Containment-Maßnahmen ergriffen. Die Ausrüstung einer industriellen Produktionsanlage zur Arbeit mit Mikroorganismen der Risikogruppe 2 oder höher verursacht demnach erhebliche Mehrkosten, die im Falle der Produktion einer Bulkchemikalie wie 1,3-Propandiol selten wirtschaftlich sind.

2.2 Glycerin

2.2.1 Eigenschaften

Glycerin (IUPAC Propan-1,2,3-triol) ist eine farblose, geruchslose, viskose Flüssigkeit mit süßem Geschmack. Es ist gut in Wasser löslich. Zudem ist es hygroskopisch, eine Eigenschaft, die Glycerin für den Einsatz als Feuchthaltemittel in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie besonders geeignet macht (vgl. Kapitel 2.2.4) (Pagliaro und Rossi, 2010).

Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol. Es ist das Grundgerüst tierischer und pflanzlicher Fette (Triglycerid, vgl. Abbildung 2.2) und fällt als Nebenprodukt in einer Reihe von Prozessen der Fett- und Öl-verarbeitenden Industrie an, hauptsächlich durch Hydrolyse bei der Produktion von Seifen (Verseifung) und Fettsäuren (Spaltung) und durch Umesterung (Biodiesel-Produktion) (da Silva et al., 2008).

Während Glycerin Anfang des letzten Jahrhunderts überwiegend als Nebenprodukt der Seifenherstellung aus tierischen Fetten anfiel, führte eine durch Produktion des Sprengstoffes Nitroglycerin zunehmende Nachfrage im ersten Weltkrieg zur Entwicklung von petrochemischen Herstellungsverfahren (Pagliaro et al., 2009).

Heute überwiegt die Gewinnung von Glycerin aus Fetten, vor allem durch die Biodiesel-Produktion (vgl. Kapitel 2.2.2), die petrochemische bei Weitem. Dow Chemicals, der nach eigenen Angaben größte Hersteller synthetischen Glycerins, schloss 2005 seine 60000 t/a Anlage in den USA (Tayler, 2008). Während die petrochemische Route zur Glycerin-Produktion über Propylen und Epichlorhydrin führt, existieren heute bereits Produktionsprozesse die aus Glycerin biogenen Ursprungs Epichlorhydrin gewinnen (Pagliaro et al., 2009).

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Glycerin sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Chemische und physikalische Eigenschaften von Glycerin (> 98 % Carl Roth, Deutschland) bei 20 °C nach Herstellerangaben

Eigenschaften	Werte
Summenformel	$C_3H_8O_3$
Strukturformel	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array} $
Erscheinung	flüssig, farblos, geruchlos
CAS-Nummer	56-81-5
Molekulargewicht	92,09 g/mol
Spezifische Dichte	1,26 g/cm ³
Dynamische Viskosität	1412 mPas
Schmelzpunkt (wasserfrei)	18,2 °C
Siedepunkt	290 °C
Zündpunkt	400 °C
Dampfdruck	<0,001 hPa
Löslichkeit in Wasser	unbegrenzt

2.2.2 Rohglycerin aus der Biodiesel-Produktion

Das heute erhältliche Glycerin stammt hauptsächlich aus der Produktion von Biodiesel. Dieser Treibstoff ist biologisch abbaubar, regenerativ und nicht-toxisch. Zudem macht die Biodiesel-Produktion in Anbetracht schrumpfender fossiler Reserven unabhängig von Erdöl-basierten Treibstoffen (Valdivieso, 2010). Biodiesel kann in Mischung mit petrochemischem Diesel oder als Reinkraftstoff eingesetzt werden. Der Treibstoff wird aus Pflanzenöl, tierischen Ölen und Fetten, Talg und Speisealtölen gewonnen, wobei die Produktion aus Pflanzenölen derzeit bei Weitem überwiegt (Vasudevan et al., 2010; Sdrula, 2010).

Die für die Biodiesel eingesetzten Rohstoffe werden kontrovers diskutiert. Das zur Umesterung verwendete Methanol ist meist fossilen Ursprungs und der Anbau von Ölpflanzen steht in Flächen- und Nutzungskonkurrenz mit der Nahrungsmittelproduktion (FNR, 2010).

Chemisch gesehen ist Biodiesel ein Fettsäurealkylester. Die Biodiesel-Herstellung ist eine Umesterung. Das Glycerin-Gerüst, an dem die Fettsäuren verestert sind, wird hierbei durch Methanol (gelegentlich Ethanol) ersetzt (Leung et al., 2010) (vgl. Abbildung 2.2). Glycerin wird abgespalten und fällt als Nebenprodukt an. Diese Reaktion erfordert in der Regel den Zusatz einer Base oder einer Säure als homogenen Katalysator.

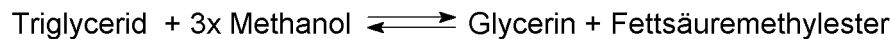
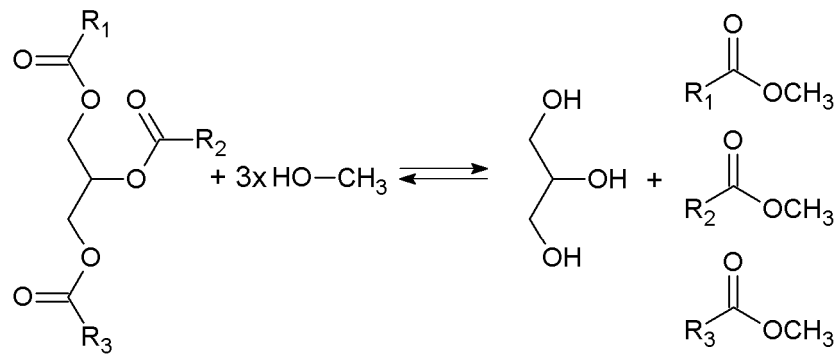


Abbildung 2.2: Chemische Synthese von Fettsäuremethylester (Biodiesel)

Basenkatalysierte Verfahren nutzen Natrium- oder Kaliumhydroxid. Die Katalysatorsalze werden mit dem Methanol vermischt, um Methanolat zu erhalten. Auf Grund geringerer Rohstoffkosten wird Natriummethanolat bevorzugt eingesetzt. Der Katalysator wird im starken Überschuss verwendet, um das Gleichgewicht der Reaktion zum Methylester zu verschieben. Das Verfahren zeichnet sich durch kurze Reaktionszeiten, moderate Reaktionsbedingungen und hohe Ausbeuten aus. Sind jedoch freie Fettsäuren im Reaktionsgemisch vorhanden, kommt es zur Bildung von Seifen. Säure-katalysierte Verfahren sind nicht so stark anfällig für Seifenbildung und liefern daher Glycerin in besserer Qualität. Der Prozess läuft langsamer ab und die Ausbeuten sind in der Regel geringer (Vasudevan et al., 2010). Aus diesem Grund werden in den meisten industriellen Prozessen derzeit alkalische Katalysatoren eingesetzt (Leung et al., 2010). Biodiesel und Glycerin befinden sich im Anschluss an die Umesterung in unterschiedlichen Phasen, so dass die Produktströme gut voneinander getrennt werden können. Der Glycerin-Strom enthält einen hohen Anteil Wasser, sowie verschiedene Verunreinigungen, hauptsächlich Methanol, anorganische Salze (durch den eingesetzten Katalysator), freie Fettsäuren, nicht reagierte Mono-, Di- und Triglyceride sowie Methylester und andere organische Bestandteile (MONG = matter organic non-glycerol) (Pagliaro et al., 2009). Die Reinheit des Nebenproduktstromes hat erheblichen Einfluss auf seinen wirtschaftlichen Wert (Zhou et al., 2008). Die Grundaufreinigung zu Rohglycerin umfasst meist eine Säurebehandlung, wodurch Seifen in freie Fettsäuren umgewandelt werden. Diese können anschließend durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt werden. Die Lösung wird neutralisiert, wobei große Mengen an Salz (Natriumchlorid oder Kaliumsulfat) entstehen. Anschließend wird überschüssiges Methanol destillativ abgetrennt und in den Prozess zurückgeführt. Dem Glycerin-Strom wird Wasser entzogen, so dass der Anteil an Glycerin zwischen 80 und 88 % (Haas et al., 2006; Vasudevan et al., 2010; Leung et al., 2010) und der Salzgehalt zwischen 5 und 7 % liegt (Lancrenon und Fedders, 2008).

In der pharmazeutischen, Kosmetik- oder Nahrungsmittelindustrie darf nur Glycerin in Pharmaqualität (Glycerin-Gehalt > 98 %) verwendet werden. Das Europäische Arzneibuch spezifiziert die erforderliche Zusammensetzung in Europa, die United States Pharmacopeia in den USA (Appleby, 2005).

2.2.3 Wirtschaftliche Entwicklung und rechtliche Lage

Die Biodiesel-Industrie in Deutschland wuchs auf Grund von Steuerfreiheit für Biodiesel bis 2006 stetig an. Mit Einführung des Energiesteuergesetzes (2006) als Ersatz für das bisher gültige Mineralölsteuergesetz und einer Reihe weiterer Gesetzesanpassungen wurde eine schrittweise Annäherung des Steuersatzes für Biodiesel an den Mineralölsteuersatz im Zeitraum von August 2006 bis 2013 beschlossen. In den Jahren 2008 und 2009 brach vor allem der Absatz von Biodiesel als Reinkraftstoff ein, da er gegenüber petrochemischem Diesel unwirtschaftlich wurde (Busse, 2010). Teilweise abgefangen wurde dieser Trend durch die EU-Direktive 2003/30/EC (2003), die bis 2010 einen Biokraftstoffanteil von 5,75 % forderte. Der Einbruch des Reinkraftstoffabsatzes und die Fixierung der Biodiesel-Beimischungsquote führten zu einer starren Nachfrage nach Biodiesel für 2009 und 2010 (vgl. Abbildung 2.4).

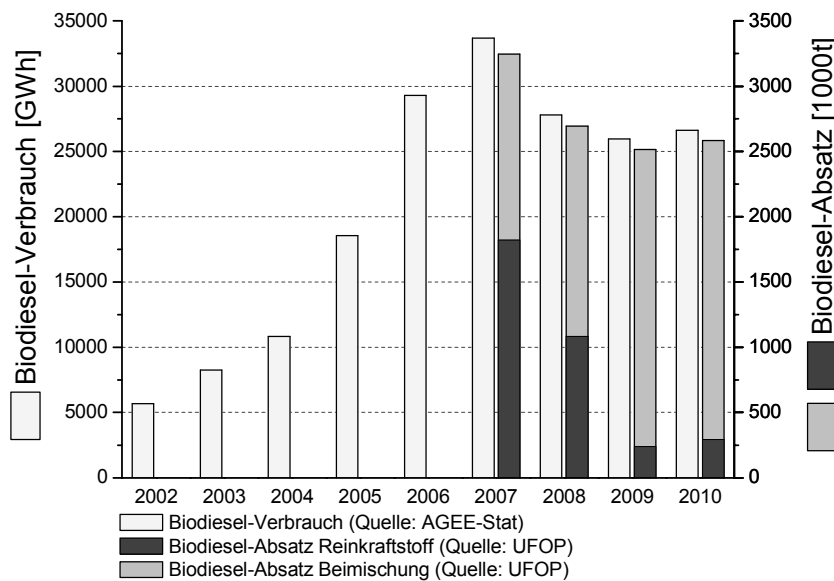


Abbildung 2.3: Entwicklung des Biodiesels in Deutschland von 2002 bis 2010 (Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat), 2011; UFOP, 2011a)

Deutschland ist derzeit der größte Biodiesel-Produzent Europas. Im Jahr 2009 wurden europaweit 9 Mio. t Biodiesel produziert (bei einer Anlagenkapazität von 22 Mio. t), der Anteil Deutschlands machte mit 2,54 Mio. t dabei den größten Anteil aus, gefolgt von Frankreich (1,96 Mio. t) und Spanien (0,86 Mio. t) (UFOP, 2010).

Etwa 70 bis 95 % der Herstellungskosten von Biodiesel werden durch Rohstoffkosten verursacht. Die Kosten für Rohstoffe und die Betriebskosten der Biodiesel-Produktion sind damit bereits fast so hoch wie der Gewinn, der gemacht werden kann (Yuste und Dorado, 2006). Die Wirtschaftlichkeit des Prozesses kann jedoch durch Nutzung der Nebenproduktströme erhöht werden (Yazdani und Gonzalez, 2007). Haas et al. (2006) haben in ihren Wirtschaftlichkeitsberechnungen einen linearen Zusammenhang zwischen dem Marktpreis von (Roh-)Glycerin und den Netto Biodiesel-Produktionskosten festgestellt. Allerdings wird die Kalkulation durch eine schwankende Marktsituation für Rohglycerin erschwert.

Es fallen für jede Tonne Biodiesel etwa 100 kg Glycerin als Nebenprodukt an. Der starke Zuwachs in der Biodiesel-Produktion in den letzten Jahren (vgl. Abbildung 2.3) führte demnach ebenfalls zu einer Zunahme an Glycerin auf dem Markt. Im Jahr 2009 betrug die Produktion von Biodiesel in Deutschland etwa 2,54 Mio. Tonnen, so dass ca. 250.000 Tonnen Glycerin entstanden, welches zunächst als Rohglycerin anfiel.

Die vollständige Aufreinigung des Rohglycerins zu Pharmaglycerin ist eine Möglichkeit der Aufwertung. Dies erfordert jedoch meist einen Vakuumdestillationsschritt, der hohe Investitionskosten und einen hohen Energieaufwand mit sich bringt. Daher ist die Aufarbeitung zu Pharmaglycerin für kleine bis mittlere Anlagen meist nicht praktikabel (Haas et al., 2006; Willke und Vorlop, 2008; Pagliaro et al., 2009). Sie reinigen die Prozesswässer zu Rohglycerin einer am Markt verkäuflichen Qualitätsstufe auf (vgl. Kapitel 2.2.2) (Haas et al., 2006).

Die Entwicklung des Preises für Glycerin war in den letzten Jahren oft unvorhersehbar. Er ist stark abhängig vom Markt für Biodiesel und Pflanzenöle sowie der Glycerin-Nachfrage.

Das starke Wachstum der Biodiesel-Produktion im Laufe des letzten Jahrzehnts und der damit einhergehende Glycerin-Überschuss führten zu einem Preisverfall. Lag der Preis für Pharmaglycerin 2001 noch bei 1500 €/t so war er 2006 auf 330 €/t gesunken (Pagliaro et al., 2009). Die veränderten politischen Rahmenbedingungen (s. o.) sowie stark erhöhte Rohstoffpreise führten 2007 zu einem erneuten Aufschwung des Glycerin-Preises, der im ersten Quartal 2008 auf 950 €/t anstieg, sich jedoch im Jahr 2009 wieder zwischen 400 und 600€/t einpendelte (Pagliaro et al., 2009). Der Preis für Rohglycerin liegt auf Grund der geringen Anzahl direkter Anwendungsmöglichkeiten (vgl. Kapitel 2.2.4) und der kostenintensiven Aufreinigung deutlich unterhalb des Preises für Pharmaglycerin. Zudem wird Rohglycerin mit einem Glycerin-Gehalt von lediglich 80 % gehandelt.

Der Rohglycerin Preis ist stark abhängig von der Nachfrage nach Pharmaglycerin, wird jedoch auch durch eine Anzahl anderer Faktoren bestimmt, wie der Entwicklung neuer, direkter Anwendungsmöglichkeiten oder der am Markt vorhandenen Aufreinigungskapazität. So stiegen die Rohglycerin Preise 2007 in den USA trotz hoher Pharmaglycerin-Preise nur moderat an, da die Aufreinigungskapazitäten für das Rohglycerin fehlten (Kotrba, 2007).

Der Biodiesel-Produzent Biopetrol, ein Kooperationspartner des IG-Biotech Verbundprojektes, erzielte im September 2009 für Pharmaglycerin 260 bis 280 €/t und für Rohglycerin (80 %) 40 bis 60 €/t. Hierbei handelt es sich allerdings um Preise ab Werk, nicht wie sonst üblich FD (free delivered). Biopetrol hat inzwischen die Schließung seiner Anlage in Schwarzheide im Juni 2011 angekündigt. Gründe hierfür seien die Überkapazitäten am Biodieselmärkt, sowie die Position der Anlage im Landesinneren und die damit einhergehende ungenügende Verkehrsanbindung (UFOP, 2011b).

Die Biodiesel-Industrie wächst weltweit weiter. Neben Europa und den USA sehen vor allem Länder der 3. Welt (asiatisch-pazifischer Raum und Lateinamerika) die Möglichkeit der Unabhängigkeit von fossilen Kraftstoffen (Retka Schill, 2010). Somit ist auch weiterhin mit einem wachsenden Glycerin-Markt zu rechnen.

2.2.4 Anwendungsgebiete

Traditionell existieren diverse Anwendungen für Glycerin. Es wird als Roh- oder Zusatzstoff in der Pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik, der Synthese von Polymeren, der Lebensmittel- und Getränkeindustrie, der Triacetin-Produktion, in der Tabakindustrie und diversen anderen Anwendungen eingesetzt (Pagliaro und Rossi, 2010). Die Nachfrage nach Glycerin durch diese Anwendungen ist jedoch konstant und kann daher das erhöhte Angebot an Glycerin nicht aufnehmen (Johnson und Taconi, 2007). Auf Grund des starken Preisverfalls für Glycerin und Rohglycerin wurde in den letzten Jahren vermehrt nach neuen Anwendungsmöglichkeiten gesucht (Nilles, 2006).

Die Aufreinigungsstufe des Glycerins ist für dessen Anwendungsmöglichkeit von hoher Bedeutung. Die Qualität des Rohglycerins aus unterschiedlichen Biodiesel-Anlagen ist nicht einheitlich bzw. in unterschiedlichen Chargen gleichbleibend. Zusammensetzung, wie Glycerin-, Methanol und Salzgehalt, sind abhängig von den verwendeten Rohstoffen, dem angewandten Prozess und der Güte der daran anschließenden Aufreinigung (Bohon et al., 2011). Glycerin-Prozesswasser kann auf Grund der hohen Konzentrationen an Verunreinigungen nur in wenigen Anwendungen eingesetzt werden. Die direkte Entsorgung ist problematisch, da der hohe Methanol-Gehalt zu einer Einstufung als Sondermüll führt (Zhou et al., 2008).

Der niedrigste Preis für Rohglycerin ist theoretisch begrenzt durch dessen Wert als Energiequelle, z. B. für Prozesswärme und Energie der Biodiesel-Anlage (Bohon et al., 2011). Ebenfalls wird Rohglycerin direkt eingesetzt, z. B. als Betonzusatz (Pagliaro et al., 2009), zur Staubkontrolle (Nilles, 2006) oder als Zusatz zu Tierfutter (UFOP, 2009).

Wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben wirken sich unvorhersehbare Preisschwankungen und geringe Gewinne aus (Roh-)Glycerin-Verkäufen direkt auf die Gewinne der Biodiesel-Herstellung aus. Die Umwandlung dieses Nebenproduktstromes in höherwertige Produkte hat daher das Potenzial, die Biodiesel-Produktion wirtschaftlicher zu machen (Choi, 2008).

Eine Möglichkeit der Aufwertung des Glycerins ist die chemische Umwandlung in Basischemikalien, Polymere oder Treibstoffe. Die chemische Struktur von Glycerin ist multifunktionell (vgl. Tabelle 2.2), so dass eine Reihe von Umsetzungen möglich sind. Ein geringer Preis für Glycerin eröffnet damit die Chance, bisher petrochemisch hergestellter Produkte auf Basis nachwachsender Rohstoffe zu produzieren.

Für die meisten chemoselektiven katalytischen Prozesse ist Glycerin mit hoher Reinheit ideal, während der direkte Einsatz von Rohglycerin auf Grund der darin enthaltenen Verunreinigungen schwierig ist (Zhou et al., 2008). Ein potenzielles Produkt muss neben einer ausreichend großen Marktkapazität ebenfalls eine wirtschaftliche Preisdifferenz zu Glycerin aufweisen. Muss das verwendete Glycerin teilweise zu technischem Glycerin oder komplett zu Pharmaglycerin aufgereinigt werden, wird die Preisdifferenz zwischen Edukt und Produkt geringer (Johnson und Taconi, 2007).

Propylenglycol (1,2-Propandiol), das traditionell aus Erdgas produziert wird, wird bereits industriell aus biogenem Glycerin hergestellt. Die massiven Preisanstiege für Erdgas und der zunehmende Ersatz des toxischen Ethylenglycols durch Propylenglycol als Frostschutz machen die chemische Produktion aus Glycerin wirtschaftlich. Senergy Chemical betreibt in den USA eine Propylenglycol-Produktionsanlage und der Biodiesel-Produzent Cargill plant eine Anlage in Europa (Zhou et al., 2008; Pagliaro et al., 2009).

Auch Epichlorhydrin, das früher ein Zwischenprodukt der synthetischen Glycerin-Produktion war, wird aus Glycerin gewonnen. Es wird zur Herstellung von Epoxydharzen verwendet. Verschiedene Unternehmen produzieren bereits Epichlorhydrin biogenen Ursprungs oder bauen Großanlagen (z. B. Solvay, Dow Chemicals) (Bell et al., 2008; Pagliaro et al., 2009).

Eine Alternative zur chemischen Umwandlung ist die biologische Konversion des Glycerins zu Spezial- oder Bulkchemikalien durch mikrobielle Fermentation. Die Vorteile gegenüber der chemischen Katalyse sind moderate Reaktionsbedingungen (Druck und Temperatur) und die Möglichkeit Rohglycerin bzw. Glycerin-Prozesswasser direkt als Substrat einzusetzen (Yazdani und Gonzalez, 2007). Glycerin ist als Bestandteil von Fetten (vgl. Kapitel 2.2.1) in der Natur weit verbreitet und kann daher von relativ vielen Mikroorganismen verwertet werden (da Silva et al., 2008).

Bei den derzeit geringen Rohglycerin-Preisen (vgl. Kapitel 2.2.3) wird Glycerin ein wirtschaftliches Fermentationssubstrat im Vergleich zu Zucker. Glycerin ist zudem ein stark reduziertes Substrat, bei dessen Abbau deutlich mehr Reduktionsäquivalente entstehen als bei höher oxidierten Zuckern. Dies bedeutet eine höhere Ausbeute bei der mikrobiellen Produktion reduzierter Produkte (Yazdani und Gonzalez, 2007). Die verschiedenen Stoffwechselwege und Fermentationsprodukte sind in Abbildung 2.4 dargestellt. Das in der Literatur am häufigsten beschriebene biotechnische Produkt aus Glycerin ist 1,3-Propandiol, dies wird näher in Kapitel 2.2.7 behandelt.

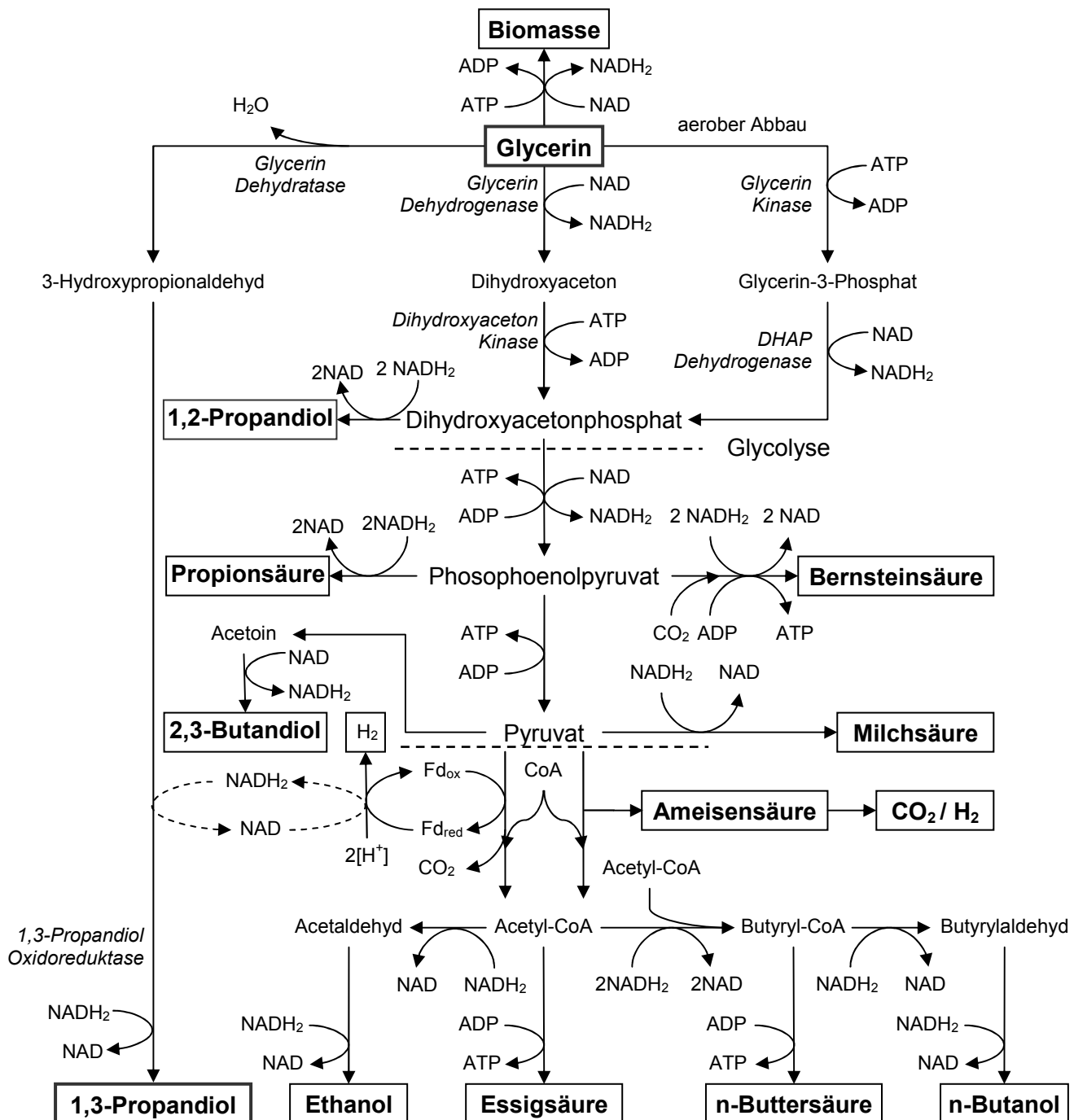


Abbildung 2.4: Mikrobielle Stoffwechselwege zur Konversion von Glycerin zu Chemikalien unter anaeroben Bedingungen; adaptiert nach Choi (2008)

1,3-Propandiol

2.2.5 Eigenschaften

1,3-Propandiol (IUPAC Propan-1,3-diol) ist eine farblose, geruchslose Flüssigkeit mit leicht süßlichem Geschmack. Es ist ein lineares aliphatisches Glycol mit zwei primären Hydroxygruppen und daher gut geeignet als Monomer für die Polymerisation (da Silva et al., 2008). Die chemischen und physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

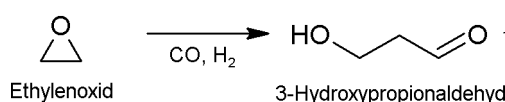
Tabelle 2.3: Chemische und physikalische Eigenschaften von 1,3-Propandiol bei 20 °C nach Steverding (2010)

Eigenschaften	Werte
Summenformel	$C_3H_8O_2$
Strukturformel	$HO-CH_2-CH_2-CH_2-OH$
Erscheinung	flüssig, farblos, geruchlos
CAS-Nummer	504-63-2
Molekulargewicht	76,09 g/mol
Spezifische Dichte	1,053 g/cm ³
Dynamische Viskosität	52 mPas
Schmelzpunkt (wasserfrei)	-27 °C
Siedepunkt	214 °C
Zündpunkt	405 °C
Dampfdruck	<0,1 hPa
Löslichkeit in Wasser	100 g/L

2.2.6 Chemische Herstellung

1,3-Propandiol wird bereits seit über 100 Jahren produziert und angewendet. Seit den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden die Anstrengungen, einen wirtschaftlichen 1,3-Propandiol-Produktionsprozess zu entwickeln, erheblich verstärkt, da preisgünstiges 1,3-Propandiol Voraussetzung für die Vermarktung des Kunststoffes Polytrimethylenterephthalat ist (PTT, vgl. Kapitel 2.2.8). Es gibt zwei kommerziell genutzte Synthesewege, die in Abbildung 2.5 dargestellt sind.

Shell-Verfahren



Degussa / DuPont-Verfahren

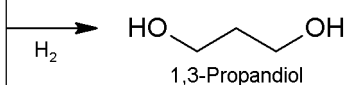
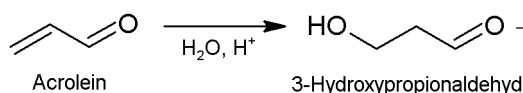


Abbildung 2.5: Chemische Synthese von 1,3-Propandiol; adaptiert nach Steverding (2010)

Das erste Verfahren wurde von Shell entwickelt. Der Ausgangsstoff Ethylenoxid wird durch Hydroformylierung zu 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA), welches anschließend zu 1,3-Propandiol hydriert wird. Das zweite Verfahren wurde von Degussa Hüls entwickelt und 1997 an DuPont verkauft. Hier wird zunächst Propylen durch katalytische Luftoxidation zu

Acrolein umgewandelt, welches dann zu 3-Hydroxypropionaldehyd hydratisiert wird. In einem zweiten Schritt wird dieses katalytisch zu 1,3-Propandiol hydriert.

Die chemischen Prozesse basieren nicht nur auf fossilen Rohstoffen, sie haben diverse Nachteile. Extreme Reaktionsbedingungen (hoher Druck und Temperatur), hohe Rohstoffkosten bzw. Katalysatorkosten und toxische Zwischenprodukte verursachen hohe Produktionskosten (Steverding, 2010; Liu et al., 2010a). Die biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol hat das Potenzial eine wirtschaftliche und nachhaltige Alternative zur chemischen Produktion zu sein.

2.2.7 Mikrobielle Herstellung

Die mikrobielle Umsetzung von Glycerin zu 1,3-Propandiol wurde erstmals von August Freund (1881) beschrieben. Er berichtete von der Bildung von 1,3-Propandiol durch spontane Fermentation einer Lauge aus der Seifenherstellung. Die mikrobiologische Untersuchung des Prozesses durch Werkman und Gillen (1932) führte erstmals zur Charakterisierung des 1,3-Propandiol-produzierenden Stammes *Citrobacter freundii*. Seitdem wurde eine Reihe von Mikroorganismen isoliert, die von Natur aus zur Produktion von 1,3-Propandiol fähig sind (vgl. Kapitel 2.3.2). Bekannte 1,3-Propandiol-bildende Bakterienarten sind einerseits Vertreter der fakultativ anaeroben *Enterobacteriaceae* (vgl. Kapitel 2.3.3.2) aus den Genera *Klebsiella* (Forage und Foster, 1982; Menzel et al., 1997; Yang et al., 2007), *Citrobacter* (Homann et al., 1990; Pflugmacher und Gottschalk, 1994; Daniel et al., 1995) und *Enterobacter* (Barbato et al., 1995) und andererseits obligat anaerobe Clostridien (Forsberg, 1987; Biebl et al., 1992) (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Zudem sind einige Milchsäurebakterien in der Lage 1,3-Propandiol mit dem Substrat Glucose und Glycerin als externem Wasserstoffakzeptor zu produzieren (Schutz und Radler, 1984a; Luthi-Peng et al., 2002).

Unter den Wildtyp-Produzenten werden *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium butyricum* als vielversprechend für den Einsatz in einem industriellen Prozess erachtet, da sie die höchsten Endkonzentrationen, Ausbeuten und Produktivitäten erreichen (Saxena et al., 2009). *K. pneumoniae* ist als fakultativ anaerobes Bakterium leichter in der Handhabung, liefert jedoch in der Regel geringere Ausbeuten als *C. butyricum*. Außerdem ist *K. pneumoniae* ein opportunistische Pathogen, wodurch die Sicherheitsvorschriften für eine industrielle Produktionsanlage erheblich verschärft werden (vgl. Kapitel 2.1.6.3). 1,3-Propandiol kann durch natürliche Mikroorganismen nur aus Glycerin hergestellt werden. Es ist derzeit kein Wildtyp-Mikroorganismus bekannt, der aus Glucose, 1,3-Propandiol produziert (Deckwer, 1995).

Der anaerobe Abbau von Glycerin erfolgt in allen Wildtypstämmen grundsätzlich gleich (vgl. Abbildung 2.4). Glycerin wird über einen Dismutationsprozess verwertet. Der oxidative Zweig dient der Energiegewinnung. Das Glycerin-Molekül wird zunächst dehydriert durch die NAD-abhängige Glycerin Dehydrogenase. Das entstandene Dihydroxyaceton wird anschließend

durch die ATP-abhängige Dihydroxyaceton Kinase zu Dihydroxyacetonphosphat phosphoryliert. Dieses kann in der Glycolyse abgebaut werden.

Die fakultativ anaeroben *Enterobacteriaceae* sind in der Lage Glycerin auch aerob abzubauen. Die Glycerin Kinase phosphoryliert Glycerin zu Glycerin-3-Phosphat. Dieses wird anschließend durch die NAD-abhängige Dehydrogenase reduziert, so dass Dihydroxyacetonphosphat entsteht (vgl. Abbildung 2.4).

Der reduktive Zweig (Abbildung 2.6) dient als Senke für die im oxidativen Zweig entstandenen Reduktionsäquivalente. Glycerin wird durch die Glycerin Dehydratase zu 3-Hydroxypropionaldehyd umgewandelt, welches durch die NADH₂-abhängige 1,3-Propandiol Oxidoreduktase zu 1,3-Propandiol reduziert wird, wobei NAD regeneriert wird. In *K. pneumoniae* benötigt die Glycerin Dehydratase den Cofaktor B12 (Liu et al., 2010b), während für *C. butyricum* VPI 3266 und VPI 1718 nachgewiesen wurde, dass dieser Schritt durch ein B12-unabhängiges, jedoch sehr Sauerstoff-empfindliches Enzym katalysiert wird (Saint-Amans et al., 2001; Raynaud et al., 2003).

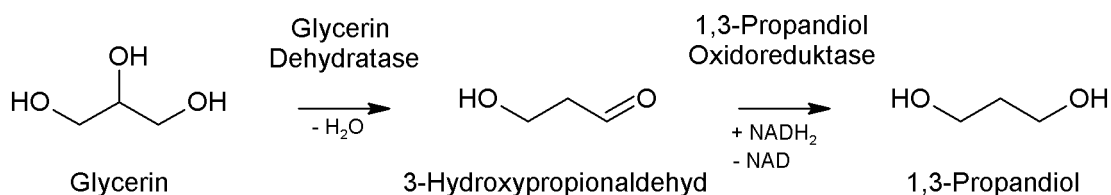


Abbildung 2.6: Mikrobielle Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol

Die Kosten der biotechnischen 1,3-Propandiol-Produktion, und damit die wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit gegenüber der chemischen Synthese, werden wesentlich durch die Parameter Ausbeute, Endkonzentration und Fermentationsdauer beeinflusst (Hirschmann et al., 2005).

Die Ausbeute der Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol ist wesentlich abhängig von den gebildeten Nebenprodukten. Zeng et al. (1993; 1996) haben die theoretisch maximale Ausbeute für *C. butyricum* und *K. pneumoniae* berechnet. Diese wird unter der Voraussetzung erreicht, dass Acetat als alleiniges Nebenprodukt entsteht, da hierbei die meisten Reduktionsäquivalente im Verhältnis zu ATP gebildet werden (vgl. Abbildung 2.4). Das bei der Oxidation von Pyruvat reduzierte Ferredoxin wird in diesem theoretischen Fall komplett auf NAD übertragen, so dass NADH₂ statt Wasserstoff entsteht. Unter Berücksichtigung der Bildung der Biomasse beträgt die theoretisch maximale Ausbeute 0,72 mol/mol (0,60 g/g). Abhängig vom verwendeten Mikroorganismus werden in der Realität diverse weitere Nebenprodukte gebildet (vgl. Kapitel 2.3.3.1 und 2.3.3.2), wodurch die Ausbeute verringert wird.

Die bisher höchsten 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen mikrobieller Fermentationen mit Glycerin wurden mittels Fed-Batch erzielt und liegen laut einer Zusammenfassung von Willke

und Vorlop (2008) zwischen 80 und 100 g/L. Die höchsten derzeit berichteten 1,3-Propandiol-Konzentrationen von Wildtyp Mikroorganismen sind 101,4 g/L für *Clostridium spezie* IK123 (Bock, 2004) und 95,39 g/L für *Klebsiella pneumoniae* HR526 (Xu et al., 2009a). Eine Mutante dieses Stammes erreichte, nach Deaktivierung des Milchsäure-Stoffwechselweges, einen Wert von 102,06 g/L 1,3-Propandiol.

Das Ende der Produktionsphase eines biotechnischen Prozesses wird durch wachstumsfeindliche Bedingungen herbeigeführt. Dies ist der Fall, wenn ein Mangel an Substrat oder Nährstoffen herrscht oder wenn eines der Fermentationsprodukte für den Produktionsstamm toxische Konzentrationen erreicht (Schlegel und Zaborosch, 1992). Zeng et al. (1994) haben die Haupt- und Nebenprodukthemmung für *C. butyricum* DSMZ 5431 (entspricht *C. diolis* DSMZ 15410) und *K. pneumoniae* DSMZ 2026 im pH-Auxostat bzw. -Chemostat untersucht und berechnet (auf Basis der experimentellen Daten von Tag (1990), Biebl (1991) und Günzel et al. (1991)). Während die Hemmwirkung von vorgelegtem und produziertem 1,3-Propandiol gleich stark war, hemmte selbstproduzierte Essig- und n-Buttersäure zwei- bis dreimal stärker als extern zugegebene. Die Hemmung durch n-Buttersäure wurde durch die Gesamtmenge bestimmt, während Essigsäure vorwiegend in der undissoziierten Form hemmte. Insgesamt war n-Buttersäure toxischer für die Produktionsstämme als Essigsäure. Für beide Stämme wurden eine Hemmung ab Produktkonzentrationen von 0,35 g/L undissoziierter Essigsäure, 10,1 g/L n-Buttersäure, 16,6 g/L Ethanol, 71,4 g/L 1,3-Propandiol und 187,6 g/L Glycerin ermittelt.

Colin et al. (2000) haben in pH-geregelten Batch-Versuchen mit dem Stamm *C. butyricum* CNCM 1211 eine komplette Hemmung des Wachstums ab einer Glycerin-Konzentration von 160 g/L und einer Anfangskonzentration von 65 g/L 1,3-Propandiol (und 20 g/L Glycerin) festgestellt. Der verwendete Stamm produzierte jedoch 1,3-Propandiol über diese Konzentration hinaus. Die höchste erreichte Konzentration betrug 83,7 g/L 1,3-Propandiol, wenn 50 g/L 1,3-Propandiol und 70 g/L Glycerin vorgelegt wurden (vollständiger Umsatz). Die Autoren schlossen, dass der hemmende Einfluss des Produktes auf das Wachstum größer ist als auf die Produktbildung.

Hirschmann et al. (2005) haben für eine 1,3-Propandiol-Produktionsanlage (Kapazität: 5 kt/a) ermittelt, dass bei Verwendung der Medienbestandteile Pharmaglycerin und Hefeextrakt die Rohstoffkosten ca. 50 % der Produktionskosten betragen. Der Einsatz von preisgünstigen Rohstoffen, vor allem der Ersatz von Pharma- durch Rohglycerin, kann die Produktionskosten erheblich senken. Die Verunreinigungen im Rohglycerin, insbesondere hohe Konzentrationen an Katalysatorsalzen und Methanol, können jedoch einen zum Teil stark hemmenden Einfluss auf Wachstum und Produktbildung von Mikroorganismen haben (Mantzouridou et al., 2008; Pyle et al., 2008). Rehman et al. (2008) konnten für *C. butyricum* DSMZ 5341 (entspricht *C. diolis* DSMZ 15410) nachweisen, dass die freien, ungesättigten Fettsäuren im

Rohglycerin, besonders Öl- und Linolsäure, zu einer deutlichen Verlängerung der Lag-Phase, verlangsamtem Wachstum und erhöhter Produktion von n-Buttersäure führten.

Der Einsatz von Rohglycerin für die mikrobielle Produktion von 1,3-Propandiol wurde in den letzten Jahren vielfach untersucht (Petitdemange et al., 1995; Barbirato et al., 1998; Papanikolaou et al., 2000; Gonzalez-Pajuelo et al., 2004; Papanikolaou et al., 2004; Hirschmann et al., 2005; Mu et al., 2006; Papanikolaou et al., 2008; Jun et al., 2009).

Die Ergebnisse liegen zumeist deutlich unterhalb derer, die mit Pharmaglycerin erreicht wurden. Für *C. butyricum* wurden bei Einsatz von Rohglycerin aus der Biodiesel-Produktion im Fed-Batch 67,9 g/L (Chatzifragkou et al., 2011), für den *Clostridium spezies* Stamm IK124 sogar 80,1 g/L 1,3-Propandiol (Hirschmann et al., 2005). Mit *K. pneumoniae* DSMZ 4799 wurden im Fed-Batch Verfahren unter Einsatz von Rohglycerin aus der Biodiesel-Produktion 80,2 g/L 1,3-Propandiol erreicht, allerdings erst nach 69 h (Jun et al., 2009).

Für die Auswahl eines geeigneten Produktionsstammes ist also eine hohe Toleranz gegenüber Glycerin und den im Rohglycerin enthaltenden Verunreinigungen ebenso ein Kriterium wie eine hohe Ausbeute, Produktivität oder Endkonzentration.

Einen kommerziellen biotechnischen Prozess zur Produktion von 1,3-Propandiol aus Glucose hat die Firma DuPont entwickelt. In Kooperation mit Genencor International wurde der Stamm *Escherichia coli* K12, welcher in den USA als Risikogruppe 1 eingestuft ist, genetisch verändert, um in einem aeroben Prozess die Produktion von 1,3-Propandiol aus Glucose zu ermöglichen. Hierzu wurden zunächst die Gene der Synthese von Glycerin aus Glucose aus *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli* K12 eingebracht (Nakamura und Whited, 2003).

Da *E. coli* von Natur aus nicht in der Lage ist, 1,3-Propandiol zu produzieren, musste außerdem dieser Stoffwechselweg inseriert werden. Für die Umsetzung zu 3-Hydroxypropionaldehyd wurden die Gene aus *K. pneumoniae* für die Glycerin Dehydratase und die reaktivierenden Faktoren eingefügt. Die weitere Umwandlung zu 1,3-Propandiol erfolgt durch eine NADPH₂-abhängige endogene Oxidoreduktase aus *E. coli*. Hierdurch konnten wesentlich höhere 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen erzielt werden, als mit der NADH₂-abhängigen Oxidoreduktase aus *K. pneumoniae*, da das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Cofaktor in *E. coli* bei NADP höher ist (Nakamura und Whited, 2003).

Zudem wurden einige weitere Modifikationen am Produktionsstamm vorgenommen, z. B. Deletionen, um den Wiedereintritt des Glycerins in den dissimilatorischen Abbau zu verhindern, der Austausch des Transportsystems für Glucose sowie die Herunterregulierung des Stoffwechselweges zum Zitronensäurezyklus. Einige zusätzliche, nicht näher beschriebene Änderungen führten zu einem Prozess mit einer Produktivität von 3,5 g/Lh, einer Endkonzentration von 135 g/L und einer Ausbeute von 51 % (Nakamura und Whited, 2003).

Als Rohstoff für den Prozess wird Glucosesirup aus Maisstärke verwendet. Die Entwicklung des Fermentationsprozesses erfolgte durch DuPont in Kooperation mit Tate & Lyle, eine

Firma, die Produkte auf Maisbasis herstellt und Erfahrung in Fermentationsprozessen hat (Kurian, 2005). Im Juni 2007 wurde eine 1,3-Propandiol-Produktionsanlage mit einer Jahreskapazität von 45000 t/a in Loudon, Tennessee (USA) eröffnet. 2010 wurde angekündigt, die Anlage wegen gesteigerter Nachfrage zu erweitern und so die Produktion um 35 % zu erhöhen (DuPont, 2010a).

Glucosesirup gilt als kostengünstiges Substrat. Mit steigenden Weltmarktpreisen für Zucker, die Preise für Weiß- und Rohzucker erreichten Ende 2010 ein 30-Jahres-Hoch (767 US\$/t Weißzucker, 685 US\$/t Rohzucker (Nolte und Grethe, 2011), stiegen ebenfalls die Preise für günstige Ersatzstoffe, wie Glucosesirup (Agrimony.com, 2011). Durch steigende Zuckerpreise und fallende (Roh-)Glycerin Preise wird Glycerin zunehmend wirtschaftlicher als Substrat. Zudem steht die 1,3-Propandiol-Produktion in direkter Konkurrenz zur Verwendung des Glucosesirups als Nahrungsmittel (da Silva et al., 2008). Die Produktion von Biodiesel und damit indirekt auch die Rohglycerin-Produktion stehen zwar ebenfalls in Konkurrenz zur Nutzung der Pflanzenöle als Lebensmittel, jedoch ist die Herstellung von Biodiesel auch aus Altölen oder nicht essbaren Ölsaaten möglich.

Ein weiterer Nachteil des DuPont-Verfahrens ist die Abhängigkeit der verwendeten Glycerin Dehydratase von dem Cofaktor B12, dessen Zugabe zum Prozess die Produktionskosten zusätzlich erhöht (Yang et al., 2007). Aerobe Prozesse haben zudem meist höhere Betriebs- und Investitionskosten als anaerobe Prozesse. Die Ausbeute ist mit dem stark reduzierten Glycerin besser als bei höher oxidierten Substraten wie Glucose oder Xylose, da hier mehr Reduktionsäquivalente entstehen (Yazdani und Gonzalez, 2007).

2.2.8 Anwendungsgebiete

Seit der Einführung wirtschaftlicher Produktionsprozesse ist 1,3-Propandiol von einem Nischenprodukt zur Bulkchemikalie geworden. Es existieren diverse Anwendungsmöglichkeiten, z. B. in Klebstoffen, Beschichtungen, Farben, Lösemitteln, in der Kosmetikindustrie, als Wärmeübergangsfluid und Frostschutzmittel (Zeng und Biebl, 2002; da Silva et al., 2008).

Als lineares aliphatisches Glycol mit zwei funktionellen Gruppen ist 1,3-Propandiol sehr gut geeignet als Monomer für die Polymerisation. 1,3-Propandiol kann in der Polykondensation eingesetzt werden, um Polyester, Polyether und Polyurethane herzustellen (da Silva et al., 2008).

Durch die Veresterung des bifunktionellen Alkohols 1,3-Propandiol mit aromatischen Dicarbonsäuren petrochemischen Ursprungs können u. a. die Polymere PTT (Polytrimethylen-terephthalat), PTN (Polytrimethylen-naphthalat) und PTI (Polytrimethylenisophthalat) gebildet werden (Shen et al., 2009). Durch den Einsatz von biotechnisch produzierter Bernsteinsäure könnte auch ein Polymer mit vollständig biogenem Ursprung hergestellt werden (Endres und Siebert-Raths, 2009).

Derzeit wird vor allem Polytrimethylenterephthalat (PTT, vgl. Abbildung 2.7), ein aliphatisch-aromatischer Polyester, großtechnisch hergestellt. Es entsteht bei der Polykondensation von 1,3-Propandiol und Terephthalsäure bzw. Dimethylterephthalat (Kurian, 2005).

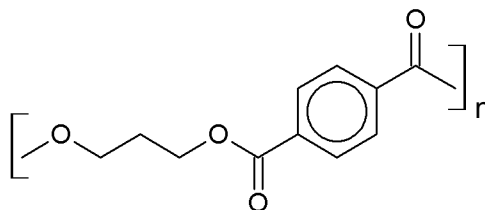


Abbildung 2.7: Molekulare Struktur von Polytrimethylenterephthalat (PTT, nach Kurian 2005)

Dieses Polymer wurde bereits 1941 entwickelt. Die industrielle Produktion war jedoch auf Grund der hohen 1,3-Propandiol-Kosten nicht rentabel (Liu et al., 2010b). Nach der Entwicklung eines wirtschaftlichen chemischen 1,3-Propandiol-Produktionsprozesses wurde PTT durch Shell unter dem Namen CorterraTM vermarktet und ab 2004, gemeinsam mit SGF Chimie, in einer neu errichteten PTT-Produktionsanlage mit einer Kapazität von 95000 t/a in Montreal (Quebec, Canada) produziert. Die Produktion wurde jedoch auf Grund mangelnder Nachfrage und globaler Überkapazität bereits 2009 wieder eingestellt (ICIS, 2009).

Das von DuPont unter dem Namen SoronaTM vermarktete PTT wurde zunächst ebenfalls mit petrochemisch hergestelltem 1,3-Propandiol produziert, seit 2007 wird jedoch das von DuPont im biotechnischen Produktionsprozess hergestellte 1,3-Propandiol (Bio-PDOTM) eingesetzt (DuPont, 2006). Die Herstellung erfolgt in umgerüsteten PET-Anlagen. Dies ist mit niedrigen Start-up Kosten verbunden (Shen et al., 2009; Endres und Siebert-Raths, 2009). DuPont gibt an, dass der Anteil an erneuerbaren Inhaltsstoffen für SoronaTM 37 % (w/w) beträgt. Inzwischen betreibt DuPont vier PTT-Produktionsanlagen (zwei in den USA und zwei in China) (DuPont, 2010b).

PTT zeigt in seinen mechanischen Eigenschaften große Ähnlichkeit mit Nylon. Es eignet sich sehr gut für den Einsatz in Teppichen und Kleidung. Es ist weich, zeigt geringe elektrostatische Aufladung, ist leicht färbbar und UV- und Chlor-resistent. Zudem ist PTT leicht zu recyceln (Kurian, 2005).

Die molekulare Struktur des PTT weist einen Knick auf, der durch eine Biegung der Bindungen des Propylen(Trimethylen)-Bestandteils verursacht wird. Es bildet sich eine Art Zickzack-Struktur aus, so dass Zug- und Druckbelastungen auf molekularer Ebene als drehen oder biegen der Bindung übersetzt werden können. Im Vergleich mit Polyethylenterephthalat (PET) und Polybutylenterephthalat (PBT) hat PTT somit verbesserte Stretch-Recovery-Eigenschaften, so dass das Material eine erheblich höhere Belastung unbeschadet überstehen kann (Kurian, 2005).

Der Marktpreis von 1,3-Propandiol war 2005 auf Grund der geringen Anzahl an Herstellern und der Anwendung von 1,3-Propandiol in überwiegend teuren Produkten mit ca. 2400 €/t

hoch (Patel et al., 2006). 2008 lag der Preis jedoch nach Kraus (2008) nur noch bei 0,80 \$/lb (ca. 1220€/t bei Annahme von $1\$ \cong 0,68\text{€}$ (02.01.2008) und $1\text{lb} \cong 0,4536\text{ kg}$) und 1,3-Propandiol hatte in den USA bereits eine Marktkapazität über 100000 t/a (Kraus, 2008). Derzeit liegt der Preis von 1,3-Propandiol bei ca. 2000 €/t (Angaben WKI; Anfrage bei DuPont).

2.3 Screening nach 1,3-Propandiol-bildenden Mikroorganismen

2.3.1 Geschäftspotenzial und Patentlage

Auf Grund der fallenden Preise wird Rohglycerin zunehmend zu einem guten biotechnischen Fermentationssubstrat. Gleichzeitig stiegen die Rohstoffpreise der Konkurrenzprozesse, Rohöl bzw. Erdgas und Zucker, an. Mit der biotechnischen Produktion von 1,3-Propandiol aus Rohglycerin entsteht zudem ein höherwertiges Produkt für die Biodiesel-Industrie. Dies trägt dazu bei den Biodiesel-Prozess insgesamt wirtschaftlicher zu gestalten. Durch den Einsatz von Glycerin als nachwachsender Rohstoff wird ebenso die Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen verringert und die Herstellung des Biopolymer PTT bringt bei den Verbrauchern Image-Vorteile. Es besteht somit ein gutes Geschäftspotenzial für die biotechnische Produktion von 1,3-Propandiol aus Rohglycerin.

Die aktuelle Patentlage zur mikrobiellen Produktion von 1,3-Propandiol ist bei Sauer et al. (2008) zusammengefasst. Die Autoren beschreiben besonders Patente zur Reduktion der Nebenprodukte durch Einsatz rekombinanter Mikroorganismen, zur Nutzung alternativer Substrate und zur Schaffung eines Cofaktor B12-unabhängigen Prozesses.

Zwei der patentierten Verfahren auf Basis von Rohglycerin waren zum Zeitraum der experimentellen Arbeiten dieses Projektes bereits in der Pilotphase.

Liu et al. (2010b) beschreibt einen Prozess auf Basis von Rohglycerin aus einem Lipase-Biodieselprozess. Unter Einsatz des genetisch veränderten *K. pneumoniae* HR526 werden seit 2008 4000 t/a 1,3-Propandiol in einer Produktionsanlage in China (Hunan Rivers Bioengineering Company) produziert (Xu et al., 2009b). Die Anwendung des opportunistischen Pathogens *K. pneumoniae* im industriellen Maßstab ist jedoch in den meisten Ländern schwierig (vgl. Kapitel 2.1.6.3). Zudem ist die enzymatische Biodiesel-Produktion industriell nicht verbreitet. Rohglycerin aus diesem Prozess weist nur sehr geringe Verunreinigungen auf (Harding et al., 2008; Nielsen et al., 2008), so dass nicht klar ist, ob der Prozess auf andere Biodiesel-Anlagen übertragen werden kann.

Metabolic Explorer nutzt einen genetisch modifizierten *Clostridium acetobutylicum* Stamm, dessen Wildtyp nicht in der Lage ist, 1,3-Propandiol zu produzieren. Das Unternehmen hat Ende 2010 angekündigt nach der erfolgreich absolvierten Pilotphase eine Produktionsanlage in Malaysia mit 50000 t/a Kapazität zu errichten (geplante Anfangsproduktion 8000 t/a) (Me-

tabolic Explorer, 2010). Genaue Parameter des Prozesses, wie Endkonzentration, Produktivität und Verträglichkeit von Rohglycerin verschiedener Qualitäten, werden nicht genannt.

Ogleich diese Prozesse auf Basis von Rohglycerin bereits angewendet werden, liegt der Fokus zumeist auf genetisch modifizierten Mikroorganismen. Ein Biodiversitätsscreening ist somit sinnvoll, da es auf verschiedene Gruppen von Mikroorganismen ausgelegt werden kann. Es berücksichtigt neben den bekannten natürlichen Produzenten auch seltene oder bisher nicht oder wenig bekannte Stämme. Zudem können Stämme isoliert werden, die bereits sehr gute Produktionseigenschaften haben und so als Ausgangsstamm für eine weitere genetische Modifikation bzw. als Lieferant von genetischem Material für einen Wirtsstamm gut geeignet sind. Es kann auch gezielt nach Stämmen gesucht werden, die gegenüber den im Rohglycerin vorhandenen Verunreinigungen oder gegenüber dem Rohglycerin eines bestimmten Herstellungsprozesses tolerant sind.

2.3.2 In der Literatur beschriebene Screening-Verfahren

Die Suche nach 1,3-Propandiol-Produzenten begann bereits Anfang des letzten Jahrhunderts. Der wirtschaftliche Verlust, der durch die spontane Fermentation des Glycerinwassers aus der Seifenproduktion auftrat, führte frühzeitig zu der Untersuchung des Phänomens. Werkman und Gillen (1932) führten ein Screening von Umweltproben nach 1,3-Propandiol-produzierenden Bakterien durch und testeten bereits bekannte Bakterienstämme. Eine Vielzahl von Screening-Verfahren nach natürlichen 1,3-Propandiol-produzierenden Mikroorganismen ist in der Literatur beschrieben.

Das Screening nach 1,3-Propanidiol produzierenden Milchsäurebakterien wird oft im Zusammenhang mit dem Verderben von alkoholischen Getränken durchgeführt. Als Nebenprodukt der alkoholischen Gärung entsteht Glycerin, bei dessen Abbau es zu geschmacklichen Veränderungen kommt, z. B. durch die Produktion organischer Säuren und von 3-Hydroxypropionaldehyd (Claisse und Lonvaud-Funel, 2000). Milchsäurebakterien sind an nährstoffreichen Standorten, wie Milchprodukten, Pflanzen und Schleimhäuten, zu finden und haben einen hohen Bedarf an Supplinen. Sie müssen daher zumeist in komplexen Medien mit hohem Anteil an Hefeextrakt kultiviert werden (Schlegel und Zaborosch, 1992). 1,3-Propandiol-Produzenten wurden aus unterschiedlichen Quellen (verdorbener Wein, Apfelwein, Bier und Sauerteig) isoliert. Beschriebene Stämme sind *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* (Schutz und Radler, 1984b), *Lactobacillus collonoides* (Claisse und Lonvaud-Funel, 2000) und *Pediococcus pentosaceus* (Pinto et al., 2004). Bis auf den letzten benötigen diese Stämme Zucker als Energiequelle und nutzen den Abbau von Glycerin zur Regeneration ihrer Reduktionsäquivalente. Die getesteten Mengen an Glycerin und daraus resultierenden 1,3-Propandiol-Konzentrationen liegen im Bereich von wenigen mmol/L. Die

Anreicherung bzw. Isolierung erfolgt zumeist direkt und unspezifisch auf komplexem MRS-Festmedium.

Auf Grund der hohen Nährstoffanforderungen, des Bedarfes an Co-Substrat und der geringen Produktkonzentrationen ist es nicht sinnvoll ein Screening-Verfahren für industrielle Produktionsstämme speziell nach Milchsäurebakterien zu konzipieren.

Screening-Verfahren nach thermophilen Produktionsstämmen könnten die Prozessführung bei Einsatz von Rohglycerin vereinfachen. Das Rohglycerin-Prozesswasser z. B. aus der Fettsäureherstellung könnte direkt bei Betriebstemperatur (ca. 60 °C) als Feed zur Fermentation zugegeben werden und die Energiekosten beim Downstream-Processing wären geringer (Wittlich et al., 2001). Solche Screening-Verfahren wurden bereits durch Wittlich et al. (2001) und Seyfried et al. (2002) durchgeführt. Die Anreicherungsbedingungen waren in beiden Fällen selektiv für moderat thermophile, anaerobe Glycerin-Verwerter. Die 1,3-Propandiol-Bildung wurde erst während oder im Anschluss an die Aufreinigung getestet. Die erreichten Produkt-Konzentrationen waren niedrig. Der neubeschriebene Stamm *Caloramator viterbensis* (Seyfried et al., 2002), der aus einer heißen Quelle isoliert wurde, produzierte 1,3-Propandiol nur im Bereich von wenigen mmol/L. Der thermophile Stamm AT1 (Wittlich et al., 2001), der vorläufig dem Genus *Clostridium* zugeordnet wurde, produzierte nur 6,4 g/L 1,3-Propandiol. Dies wurde auf starke Produkthemmung zurückgeführt.

In der Literatur sind diverse Screening-Verfahren nach mesophilen 1,3-Propandiol-Produzenten für den Einsatz als industrielle Produktionsstämme beschrieben. Diese sind in der Tabelle 2.4 zusammengestellt.

Proben wurden in der Regel an Standorten mit einer hohen Dichte an Mikroorganismen (Klärschlamm, Kompost, Gewässersedimente etc.) entnommen. In einigen Verfahren wurden jedoch auch ungezielt genommene Erdproben verwendet (Zhang et al., 2007a; Hao et al., 2008a). Sattayasamitsathit et al. (2011) haben den bei weitem höchsten Durchsatz mit 60 Umweltproben, die an Standorten mit z. T. selektiver natürlicher Anreicherung, wie Biodieselanlagen, entnommen wurden.

Eine Probenbehandlung in Form von Pasteurisierung wurde in zwei Fällen (Biebl et al., 1992; Petitdemange et al., 1995) durchgeführt, da hier die Verfahren auf die Anreicherung von Clostridien ausgelegt waren.

Die Anreicherungsbedingungen in den beschriebenen Verfahren unterscheiden sich nur wenig. Es wird zumeist Mineralsalzmedium oder komplexes Nährmedium mit geringen Konzentrationen an Pharmaglycerin (10 - 20 g/L) verwendet. Die beschriebenen Verfahren sind somit selektiv für Glycerin-verwertende Mikroorganismen. Der Test auf 1,3-Propandiol-Bildung erfolgt direkt durch HPLC- oder GC-Analyse (in älteren Veröffentlichungen enzymatisch) im Anschluss an die Aufreinigung der Reinkultur.

Tabelle 2.4: Zusammenfassung in der Literatur beschriebener Screening-Verfahren nach natürlichen Produktionsstämmen für die 1,3-Propandiol-Produktion aus Glycerin

Literaturquelle	Probe / Vorbehandlung	Anreicherungsmedium / Sauerstoffbedingungen	Isolierungsmethode / Kultivierungsmedium	Selektivität	Produktionsstämme / max. 1,3-PD
(Homann et al., 1990)	Kompost Teichsediment Klärschlamm	MSM* (20 g/L PG**) anaerob	Schüttelagar-Methode in Festmedium (wie Anreicherung)	Anaerobe Glycerin-Verwerter	<i>C. freundii</i> / 28 g/L (Batch) <i>K. oxyfoca</i> / 18 g/L (Batch) <i>K. pneumoniae</i>
(Biebl et al., 1992)	Kompost zersetztes Stroh Flusssediment Pasteurisiert	MSM (20 g/L PG) anaerob	Schüttelagar-Methode in Festmedium (wie Anreicherung)	Anaerobe Sporen-bildende Glycerin-Verwerter	<i>C. butyricum</i> DSM 5431 / 56 g/L (Batch) <i>C. butyricum</i> DSM 5430
(Barbirato et al., 1995)	Klärschlamm (Brennerei)	MSM (20 g/L PG) anaerob	Vereinzelnung auf komplexem Festmedium	Anaerobe Glycerin-Verwerter	<i>E. agglomerans</i> / 20 g/L (Batch PG)
(Petitdemange et al., 1995)	Gewässersediment Hitzeschock: 80 °C, 10 min	Komplex Medium (10 g/L PG) anaerob	Vereinzelnung auf Fest- medium (wie Anreicherung)	Anaerobe Sporen-bildende Glycerin-Verwerter	<i>C. butyricum</i> E5 / 65,6 g/L (Fed-Batch) 58,0 g/L (Fed-Batch RG***)
(Zhang et al., 2007a)	Erdproben	MSM (20 g/L PG) anaerob	Vereinzelnung auf Fest- medium (wie Anreicherung)	Anaerobe Glycerin-Verwerter	<i>K. pneumoniae</i> XJ-Li / 38 g/L (Fed-Batch)
(Hao et al., 2008a)	Erdproben	Komplex Medium (10 g/L PG) aerob	Vereinzelnung auf Fest- medium (wie Anreicherung)	Aerotolerante Glycerin-Verwerter	<i>K. pneumoniae</i> TUAC01 / 66,3 g/L (Fed-Batch)
(Petrova et al., 2009)	Klärschlamm	Keine Anreicherungsphase	Direkte Vereinzelnung auf komplexem Festmedium (10 g/L PG)	Glycerin-Verwerter	<i>K. pneumoniae</i> / 25,86 g/L (Batch)
(Sattayasamitsathit et al., 2011)	60 Proben Erde / Abwasser aus Biodiesel-Anlage und Agrarbetrieben	MSM (20 g/L PG) micro-aerophil und anaerob	Vereinzelnung auf MacConkey-Agar für <i>Enterobacteriaceae</i>	Anaerobe und aerotolerante Glycerin-Verwerter	<i>K. pneumoniae</i> / 24,98 g/L (Batch RG)

* MSM: Mineralsalzmedium; ** PG: Pharmaglycerin; *** RG: Rohglycerin

Die Sauerstoffbedingungen der Anreicherung variieren von anaerob zu aerob, abhängig davon, ob in dem Screening strikt anaerobe Mikroorganismen wie Clostridien oder fakultativ anaerobe *Enterobacteriaceae* isoliert werden sollten.

Die neu isolierten Produktionsstämme werden in den in Tabelle 2.4 zitierten Screening-Verfahren in der Regel anschließend an das Screening auf ihre Produktbildungskapazität im pH-geregelten Bioreaktor evaluiert.

2.3.3 Taxonomische Gruppen mit 1,3-Propandiol-Produzenten

2.3.3.1 Phylogenie und Physiologie des Genus *Clostridium*

Die Definition der Spezies, die dem Genus *Clostridium* angehören, war lange Zeit sehr allgemein. Alle Endosporen-bildenden, obligat anaeroben Gram-positiven Mikroorganismen, die nicht zu dissimilatorischer Sulfatreduktion fähig waren, wurden in diesem Genus zusammengefasst. Phänotypisch bilden Clostridien deshalb eine sehr heterogene Gruppe. Molekulargenetische Untersuchungen, vor allem Analysen der 16S rDNA (vgl. Kapitel 2.1.6.2), haben gezeigt, dass innerhalb des Genus eine große phylogenetische Diversität herrscht. Viele Spezies, die auf Grund ihrer phänotypischen Merkmale den Clostridien zugeordnet wurden, sind näher mit anderen phylogenetischen Gruppen verwandt als mit *Clostridium butyricum*, dem Typstamm des Genus. Die Gruppe der Clostridien, die mit dem Typstamm nah verwandt ist, wird als *Clostridium* sensu stricto bezeichnet (Mitchell, 2001). Da die bekannten 1,3-Propandiol-bildenden Clostridien Stämme dieser Gruppe angehören, werden im Folgenden die anderen phylogenetischen Zweige des Genus nicht weiter berücksichtigt.

Die Spezies der *Clostridium* sensu stricto bilden gerade bis leicht gebogene Stäbchen, die meist 0,5 bis 1,8 µm breit und 1,5 bis 5 µm lang sind. Einige Stämme bilden während der Sporulation Zellen mit einer Länge von bis zu 20 µm (Mitchell, 2001). Viele Stämme zeigen unter speziellen Wachstumsbedingungen pleomorphe Formen, z. B. unregelmäßige Stäbchen, verdickte Enden oder filamentöses Wachstum (vgl. Abbildung 2.8, A). Die Mehrheit der Stämme sind beweglich mit peritricher Begeißelung (Mitchell, 2001; Wiegel et al., 2006).

Bekannte pathogene Vertreter sind *Clostridium tetani* und *Clostridium botulinum*. Beide Stämme produzieren starke Neurotoxine (Wang et al., 2000; Pourshaban et al., 2002). Es wurden jedoch auch andere Clostridien Stämme, die Botulinum Toxine bildeten, entdeckt. Bei mehreren Stämmen der Spezies *Clostridium butyricum*, die in Zusammenhang mit Krankheitsverläufen und aus Bodenproben isoliert wurden, wurde die Bildung des Botulinum Typ E Toxins nachgewiesen (Wiegel et al., 2006).

Endosporen sind bakterielle Dauerformen, die resistent gegenüber Hitze, Chemikalien und Strahlung sind. Sie sind lichtmikroskopisch im Phasenkontrast als sehr helle, reflektierende runde oder ovale Objekte zu erkennen, die entweder frei im Medium oder noch im Zytoplasma der Mutterzelle erkennbar sind (vgl. Abbildung 2.8, B und C).

Auf Grund ihrer Fähigkeit Sporen zu bilden, sind Clostridien nahezu ubiquitär vorhanden. Bevorzugte Habitate sind Böden, da bei den hier herrschenden stark variablen Umweltbedingungen (Nährstoffgehalt, Temperatur, Wasseraktivität) Sporen-Bildner einen Selektionsvorteil haben (Bast, 2001). Clostridien sind in tiefen, anaeroben Bodenschichten zu finden und in oberen Bodenschichten, in denen anaerobe Mikronischen durch die metabolische Aktivität aerober und fakultativ anaerober Mikroorganismen geschaffen wurden (Bast, 2001; Wiegel et al., 2006). Daneben kommen Clostridien in Süßwasser-Sedimenten und im Verdauungstrakt von Mensch und Tier vor (Kawasaki et al., 1998).

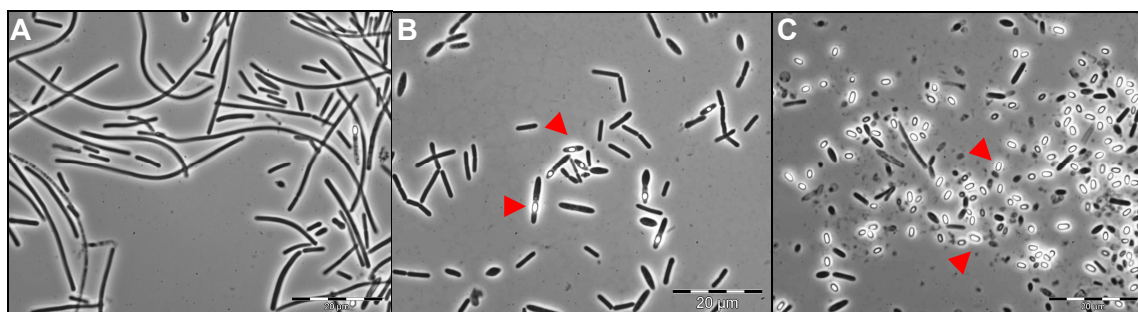


Abbildung 2.8: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme des Stammes *C. butyricum* NRRL 1024 bei Kultivierung in Standardmedium (Mineralsalzmedium mit 25 g/L Pharmaglycerin und 1 g/L Hefeextrakt), Maßstab = 20µm: (A, B) Kultivierung auf Festmedium; (C) Kultivierung in Flüssigmedium

Clostridium butyricum ist ein mesophiles, saccharolytisches Bakterium, das Stickstoff fixieren kann. Der Metabolismus des Stammes ist obligat anaerob. Der Stamm hat in der Wachstumsphase eine relativ hohe Toleranz gegenüber Sauerstoff. Das Wachstum wird in Anwesenheit von Sauerstoff zunächst eingestellt. Über mehrere Enzymsysteme ist der Mikroorganismus jedoch in der Lage anoxische Bedingungen zu schaffen und das Wachstum wieder aufzunehmen (Mitchell, 2001; Wiegel et al., 2006).

Die meisten Stämme der Gruppe *Clostridium* sensu stricto sind neutrophil (pH 6,5 bis 7). Bei Inkubation in komplexen Medien kann bei Produktion organischer Säuren der pH-Wert auf unter pH 5 sinken. Jedoch sind die meisten Stämme nicht in der Lage, Wachstum bei diesen niedrigen pH-Werten zu initiieren. Das Temperaturoptimum liegt meist im mesophilen Bereich (30 bis 40 °C) (Mitchell, 2001). In der Regel sind Clostridien heterotroph, wobei sie saccharolytisch, proteolytisch oder beides sind. Fermentationsprodukte dieser Gruppe sind organische Lösungsmittel, gemischte oder einzelne organische Säuren und Alkohole, z. B. n-Butter-, Essig- und Milchsäure, Ethanol, Propanol oder Butanol (Brock et al., 2000).

2.3.3.2 Phylogenie und Physiologie der *Enterobacteriaceae*

Viele Enterobakterien sind pathogen für Menschen, Tiere oder Pflanzen. Die Einordnung der *Enterobacteriaceae* erfolgte lange nach phänotypischen Merkmalen, wie Morphologie, biochemischen und serologischen Tests, nach Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen

sowie nach Assoziation mit Krankheiten, wie Typhus (*Salmonella typhi*), Dysenterie (*Shigella dysenteriae*) und Cholera (*Vibrio cholerae*) (Brock et al., 2000; Francino et al., 2006).

Die Familie der *Enterobacteriaceae* enthält Gram-negative, kleine Stäbchen. Enterobakterien sind fakultativ anaerob, meist beweglich und bilden keine Sporen. Die Stämme sind Katalase-positiv und Oxidase-negativ, Nitrat wird zu Nitrit reduziert. Glucose wird über die Glycolyse abgebaut. Bei anaeroben Abbau von Glucose entstehen entweder durch gemischte Säuregärung organische Säuren wie Essig-, Milch- und Bernsteinsäure (z. B. *Citrobacter*) oder durch Butanolgärung hauptsächlich Butanol, Ethanol, Kohlendioxid und Wasserstoff (z. B. *Klebsiella*, *Enterobacter*) (Francino et al., 2006; Brisse et al., 2006).

Phylogenetische Untersuchungen der 16S rDNA und anderer Housekeeping Gene haben gezeigt, dass die Verwandtschaftsverhältnisse in der Gruppe der *Enterobacteriaceae* nicht eindeutig sind. Die verschiedenen Arten sind oft sehr nah miteinander verwandt und viele Genera sind polyphyletisch, d. h. Arten gehen nicht auf eine gemeinsame Stammart zurück. Da zahlreiche Vertreter aus dem Darm von Säugetieren isoliert wurden, erhielt das Genus den Namen *Enterobacteriaceae*. Sie sind jedoch auch in terrestrischen und aquatischen Lebensräumen sowie assoziiert mit Pflanzen, Insekten oder Tierwirten zu finden. (Podschun und Ullmann, 1998; Brisse et al., 2006; Bundesumweltamt, 2009)

Neben den bereits genannten pathogenen Vertretern, sind viele Arten der Gattungen *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Serratia* opportunistische Pathogene. Sie sind als Kommensale in der natürlichen Darmflora vorhanden, können jedoch bei immungeschwächten Personen zu Erkrankungen wie Harnwegsinfekten, Lungenentzündung, Sepsis und Wundinfektionen führen (Bearson et al., 1997).

Enterobacteriaceae sind in der Regel neutrophil. Sie sind jedoch an Umgebungen mit extremen pH-Wert angepasst, wie z. B. dem menschlichen Magen-Darm-Trakt (Borenshtein und Schauer, 2006; Brisse et al., 2006; Grimont und Grimont, 2006). Das Temperaturoptimum liegt im mesophilen Bereich, zwischen 30 und 35 °C, bei klinischen Isolaten oft auch bei 37 °C (Neilson und Sparell, 1976). Viele Enterobakterien, besonders der Gattungen *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia* und *Escherichia*, sind in der Lage unter anaeroben Bedingungen Stickstoff zu fixieren (2006).

3 Material und Methoden

3.1 Lösungen und Kultivierungsmedien

Für die Herstellung der Lösungen und Medien wurden Substanzen in pro analysi Qualität von Merck (Deutschland), Sigma-Aldrich (USA) oder Carl Roth (Deutschland) verwendet. Eine Ausnahme bildeten die eingesetzten Rohglycerine (Tabelle 3.4), sowie die Ersatzstoffe für Hefeextrakt (Tabelle 3.5).

3.1.1 Spurenelementlösung

Dem verwendeten Kultivierungsmedium wurde die Spurenelementlösung des Thermoanaerobium Medium DSMZ Mediums 144 (DSMZ, 2011) zugesetzt. Die Lösung wurde entsprechend Tabelle 3.1 in fünffacher Konzentration hergestellt, um eine genauere Einwaage der einzelnen Bestandteile zu ermöglichen und die Menge an Spurenelementlösung, die dem Medium zugesetzt wird, zu minimieren.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Spurenelementlösung DSMZ 144

Substanz	Menge
Nitrilotriessigsäure	64,00 g
FeCl ₃	0,69 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,50 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,85 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,50 g
ZnCl ₂	0,50 g
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,12 g
H ₃ BO ₃	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,05 g
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,13 g
NaCl	5,00 g
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	0,10 g
H ₂ O (deionisiert)	ad 1000 mL

Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (5 mol/L) auf pH 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert (Tischautoklav 2540 ELC; Tuttnauer, Niederlande) und bei 4°C gelagert.

3.1.2 Mineralsalzmedium

Alle Kultivierungen wurden in einem halb-synthetischen Mineralsalzmedium durchgeführt. Der Hefeextrakt wurde in der Qualität „granuliert für die Mikrobiologie“ von Merck (Deutsch-

land; Bestellnummer 1.03753) bezogen. Die Standardzusammensetzung ist in Tabelle 3.2 gegeben. Abweichungen von der Zusammensetzung werden an entsprechender Stelle genannt.

Tabelle 3.2: Standardzusammensetzung des Mineralsalzmediums

Substanz	Menge
KH ₂ PO ₄	9,090 g
NH ₄ Cl	0,530 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,123 g
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	0,017 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,010 g
Hefeextrakt	1,000 g
Resazurin; 0,1%	1 mL
Spurenelementlösung DSMZ 144 (5x)	2 mL
Glycerin	variabel
H ₂ O (deionisiert)	ad 1000 mL
L-Cystein · HCl · H ₂ O	0,280 g

Glycerin wurde dem Medium in variablen Mengen in der Form von Pharmaglycerin (>98 % Glycerin-Gehalt, Carl Roth) oder Rohglycerin (vgl. Tabelle 3.4) beigelegt.

Zur Bereitung des anaeroben Mediums wurden zunächst alle Bestandteile mit Ausnahme des L-Cysteins gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge (5 mol/L) auf pH 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde auf ca. 80 °C erhitzt, um den gelösten Sauerstoff aus der Flüssigphase zu verdrängen. Anschließend wurden 0,28 g/L des Reduktionsmittels L-Cysteinhydrochlorit-Monohydrat ($E'_0 = -340$ mV) hinzugefügt, um reduzierte Bedingungen zu schaffen. Das heiße Mineralsalzmedium wurde für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Das Medium wurde dem Autoklaven bei >85 °C entnommen, unmittelbar verschlossen und in der Anaerobierbank (Abbildung 3.1) gelagert. Der im Medium enthaltene Redoxindikator Resazurin ermöglichte eine unmittelbare Beurteilung des Redoxpotentials (Umschlag von blass rot bei $E_h = +10$ mV zu farblos bei $E_h = -110$ mV).

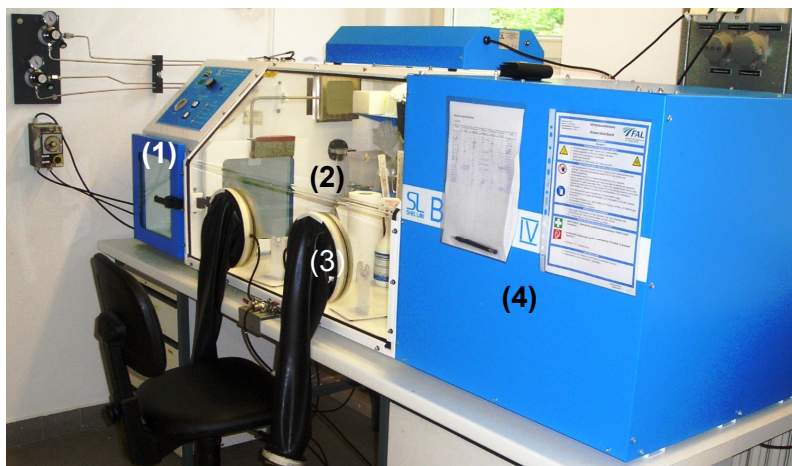


Abbildung 3.1: Anaerobierbank Bactron IV der Firma SHEL LAB (USA); (1) Vakuumschleuse, (2) anaerober Arbeitsraum, (3) handschuhfreie Armschleuse, (4) Inkubator

3.1.3 Vitaminlösung DSMZ 141

Im Mineralsalzmedium wurden zum Ersatz bzw. der Reduktion des Hefeextraktes alternativ die Vitaminlösung DSMZ 141 (DSMZ, 2011) verwendet. Anstelle des Hefeextraktes wurden 5 mL/L Vitaminlösung eingesetzt. Die Lösung wurde in zehnfacher Konzentration entsprechend Tabelle 3.3 hergestellt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Vor Gebrauch wurde die Vitaminlösung steril filtriert (Spritzenfilter, Porengröße: 0,22 µm).

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Vitaminlösung DSMZ 141

Substanz	Menge
Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin-HCl	100 mg
Thiamin-HCl · 2 H ₂ O	50 mg
Riboflavin	50 mg
Nikotinsäure	50 mg
D-Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin B ₁₂	1 mg
p-Aminobenzoesäure	50 mg
Liponsäure	50 mg
H ₂ O (deionisiert)	ad 1000 mL

3.1.4 Rohglycerin-Chargen

Das in dieser Arbeit verwendete Rohglycerin stammte aus der Biodiesel-Produktion und wurde von der Firma Biopetrol Schwarzheide GmbH (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle Rohglycerin-Konzentrationen, die in dieser Arbeit angegeben sind, beziehen sich auf den absoluten Glycerin-Gehalt der Lösung. Die tatsächlich eingesetzte Menge des Rohgly-

cerins ist bestimmt durch den in Tabelle 3.4 angegebenen Glycerin-Gehalt und folglich abhängig von den Verunreinigungen bzw. dem Wassergehalt des Rohglycerins.

Die Herstelleranalysen der 3 Chargen Rohglycerin, die für Screening und Stammevaluierung eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3.4 angegeben. Der Glycerin-Gehalt des Rohglycerins wurde überprüft. Hierzu wurde 1 g Rohglycerin in einem Volumen von 100 mL Reinstwasser (Milli-Q Plus 185, Millipore, USA) aufgenommen und die Glycerin-Konzentration mittels HPLC-Messung bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.1). Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3.4 dargestellt. Die durch HPLC bestätigten Werte wurden für die Berechnung der in den Medien eingesetzten Rohglycerin-Mengen verwendet.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Rohglycerins nach Herstellerangaben (Biopetrol Schwarzheide GmbH, Deutschland)

Rohglycerin-Charge	1	2	3
Analysedatum	23.07.07	04.08.08	05.05.10
Glycerin-Gehalt [%]	50,9	48,0	47,3
Wassergehalt [%]	48,0	44,4	49,4
pH-Wert [-]	5,9	6,2	5,6
Chlorid [ppm]	64	10	31408
Aschegehalt [%]	2,2	3,4	n. b.
Fettsäuregehalt [%]	<0,5	n. b.	1,0
Glycerin-Gehalt (HPLC) [% (w/w)]	52,0	46,5	55,0
Einsatz in Screening Durchgang	1	2, 3	4

Das Rohglycerin stammt aus der Produktion der Biopetrol Schwarzheide GmbH. Die Charge 1 und 2 wurde an derselben Stelle der Produktionskette entnommen und stammte aus dem gleichen Herstellungsverfahren. In diesem Verfahren wurde der Katalysator Kaliummetholat für die Umesterung des Pflanzenöls eingesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurden Biodiesel und Rohglycerin getrennt und das letztere mittels Schwefelsäure angesäuert. Hierdurch wurden Methanolat und Seifen in Methanol, Salze und freie Fettsäuren überführt, so dass das Methanol destillativ abgetrennt werden konnte. Die ausgefallenen Salze wurden abdekantiert und die freien Fettsäuren bei Betriebstemperatur (50 - 60 °C) abgetrennt. Das so aufbereitete Rohglycerin wurde von Biopetrol entnommen. Bei Abkühlung des Rohglycerins kam es zur Absetzung eines Teils der zuvor gelösten Fettsäuren, so dass sich eine zweite Phase ausbildete (vgl. Abbildung 3.2).

Das Rohglycerin der Charge 3 wurde nach einer Umstellung des oben beschriebenen Prozesses entnommen. Aufgrund geringerer Kosten wurde das Kaliummetholat durch Natriummetholat ersetzt. Die Ansäuerung des Rohglycerins erfolgte durch Salzsäure. Die Prozessumstellung führte zu einer drastischen Erhöhung des Chlorid-Gehaltes auf das 100-fache des vorherigen Wertes.

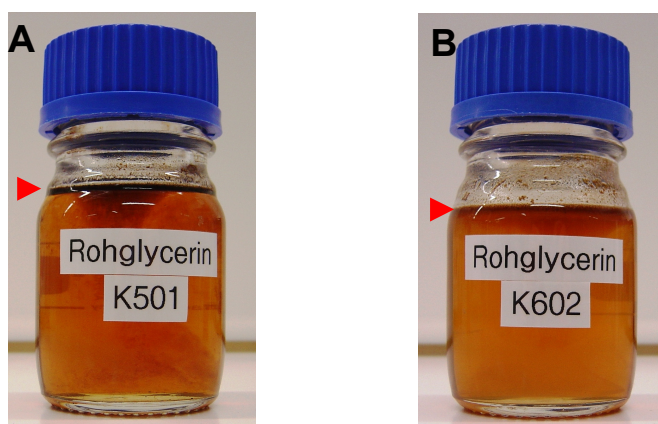


Abbildung 3.2: Vergleich der Rohglycerine vor und nach Umstellung des Biodiesel-Herstellungsprozesses; (A) Rohglycerin der 2. Charge, Katalysator Kaliummetholat (B) Rohglycerin der 3. Charge, Katalysator Natriummetholat

3.1.5 Ersatz komplexer Medienbestandteile

Zum Ersatz bzw. zur Reduktion des Hefeextraktes im verwendeten Mineralsalzmedium wurden alternativ Vitaminlösung DSMZ 141 (Tabelle 3.3) oder komplexe Substrate aus der Tierfuttermittelindustrie verwendet.

Die Ersatzstoffe für Hefeextrakt, die im Anreicherungsmedium für Screening Durchgang 4 verwendet wurden, sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Diese erwiesen sich in Untersuchungen mit den Reinkulturen AKR17a und AKR102a als geeignet (Wilkins, 2012).

Tabelle 3.5: Tierfuttermittelzusätze für als Ersatz für Hefeextrakt

Substanz	Bezugsquelle
Kartoffelprotein	Institut für Tierernährung des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI)
Sojaproteinkonzentrat	Institut für Tierernährung des FLI
Weizenkleber	Institut für Tierernährung des FLI
Maiskleber (Concentra)	Watenburg & Co, Deutschland

3.1.6 Zusammensetzung der Screening-Medien

Die Anreicherungs- und Evaluierungsmedien wurden basierend auf dem Standardmineralsalzmedium (3.1.2) entwickelt. Variiert wurden die Quelle und die Konzentration des Glycerins sowie die eingesetzte Menge an Hefeextrakt bzw. der eingesetzte Ersatzstoff. Weiterhin wurden pH-Indikatoren und pH-Puffersubstanzen, sowie die Haupt- und Nebenprodukte als Inhibitoren eingesetzt.

Um die zum Teil komplexen Zusammensetzungen der Anreicherungsmedien kurz darstellen zu können, wurden Medienkurzbezeichnungen eingeführt (Abbildung 3.3).

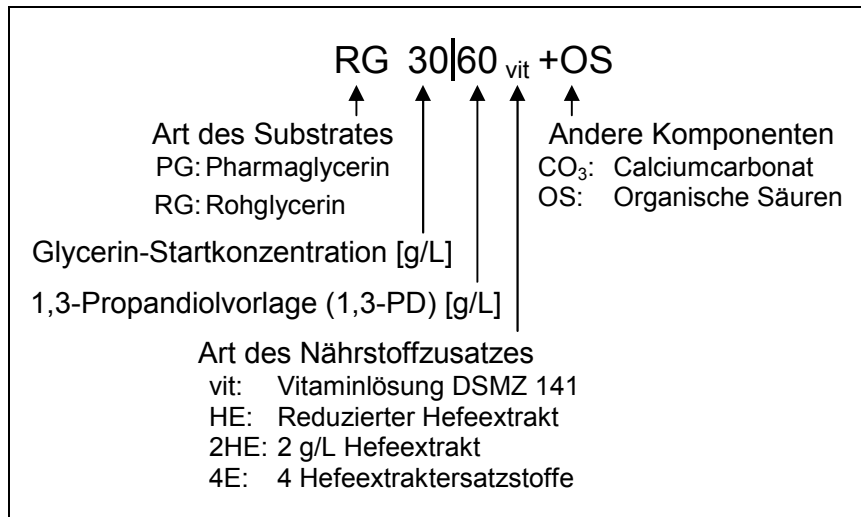


Abbildung 3.3: Erläuterung zur Medienkurzbezeichnung für Screening-Medien

Die Art der Nährstoffquelle wird angegeben, sofern sie von der Standardkonzentration an Hefeextrakt (1 g/L vgl. Tabelle 3.2) abweicht.

In Einzelfällen werden neben 1,3-Propandiol auch andere Medienkomponenten zugesetzt, die von der Standardzusammensetzung abweichen. Calciumcarbonat wurde gemäß der Optimierung (vgl. Kapitel 4.2) zwischen 20 und 30 g/L zugegeben. Die Nebenprodukte n-Buttersäure und Acetat (organische Säuren) wurden näherungsweise in Konzentrationen zugefügt, die bei einer Fermentation mit dem im Screening Durchgang 1 isolierten Stamm AKR17a bei gleicher 1,3-Propandiol-Konzentration gebildet wurden (Wilkens, 2012).

Die variablen Parameter der Anreicherungsmedien sind in Tabelle 3.6 dargestellt, die der Evaluierungsmedien in Tabelle 3.7. Für die Evaluierungsmedien wurden in der Regel die Rohglycerin-Chargen verwendet, die auch in der Anreicherung zum Einsatz kamen.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der Anreicherungsmedien für die Screening-Durchgänge 1 bis 4

Screening	Medien- bezeichnung	Zugesetzte Nährstoffquelle		Zugesetztes Substrat [g/L]		Inhibitorzusatz [g/L]			CaCO ₃ pH-Pufferung	pH- Indikator
		Art des Substrates	[g/L]	Pharma- glycerin	Rohglycerin	Charge	n-Butter- säure	Essig- säure		
1	PG 5 0	Hefeextrakt	1	5	-	-	-	-	-	-
	PG 10 0	Hefeextrakt	1	10	-	-	-	-	-	-
	PG 15 0	Hefeextrakt	1	15	-	-	-	-	-	-
	PG 50 0	Hefeextrakt	1	50	-	-	-	-	-	-
	RG 5 0	Hefeextrakt	1	-	5	-	-	-	-	-
	RG 10 0	Hefeextrakt	1	-	10	1	-	-	-	-
	RG 15 0	Hefeextrakt	1	-	15	-	-	-	-	-
	RG 50 0	Hefeextrakt	1	-	50	-	-	-	-	-
2	RG 50 0	Hefeextrakt	1	-	50	-	-	-	-	-
	RG 100 0	Hefeextrakt	1	-	100	-	-	-	-	-
	RG 150 0	Hefeextrakt	1	-	150	-	-	-	-	-
	RG 15 40	Hefeextrakt	1	-	15	-	-	-	-	-
	RG 15 70	Hefeextrakt	1	-	15	2	-	-	-	-
	RG 15 100	Hefeextrakt	1	-	15	-	-	-	-	-
	RG 15 40+OS	Hefeextrakt	1	-	15	-	7,5	2,5	-	-
	RG 15 70+OS	Hefeextrakt	1	-	15	-	15,0	5,0	-	-
	RG 15 100+OS	Hefeextrakt	1	-	15	-	22,5	7,5	-	-
	RG 30 60 _{vit}	VL DSMZ 141	5 mL/L	-	30	-	-	-	-	+
3	RG 30 60 _{HE}	Hefeextrakt	0,05	-	30	-	-	-	-	+
	RG 30 80 _{vit}	VL DSMZ 141	5 mL/L	-	30	2	-	-	-	+
	RG 30 80 _{HE}	Hefeextrakt	0,05	-	30	-	-	-	-	+
	RG 25 0 _{vit+HE}	Hefeextrakt + VL DSMZ 141	0,05 g/L + 5mL/L	-	25	-	-	-	-	+
	RG 60 60 _{4E} +CO ₃	4 Ersatzstoffe	je 0,25	-	60	3	-	-	+	+

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Evaluierungsmedien für die Screening-Durchgänge 2 bis 4

Evaluierungsparameter	Medienbezeichnung	Zugesetzte Nährstoffquelle Art des Substrates	[g/L]	Zugesetztes Substrat Pharmaglycerin Rohglycerin	1,3-PD-Vorlage [g/L]	CaCO ₃ pH-Pufferung	pH-Indikator
1,3-Propandiol-Bildung							
Pharmaglycerin Verwertung	PG 100 0 _{2HE} +CO ₃	Hefeextrakt	2	100	-	+	-
	PG 150 0 _{2HE} +CO ₃	Hefeextrakt	2	150	-	+	-
	PG 200 0 _{2HE} +CO ₃	Hefeextrakt	2	200	-	+	-
Rohglycerin Verwertung	RG 100 0 _{2HE} +CO ₃	Hefeextrakt	2	-	100	+	-
	RG 150 0 _{2HE} +CO ₃	Hefeextrakt	2	-	150	+	-
	RG 200 0 _{2HE} +CO ₃	Hefeextrakt	2	-	200	+	-
1,3-Propandiol-Toleranz	PG 60 30+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	30	+	-
	PG 60 40+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	40	+	-
	PG 60 50+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	50	+	-
	PG 60 60+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	60	+	-
	PG 60 70+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	70	+	-
	PG 60 80+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	80	+	-
	PG 60 90+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	90	+	-
	PG 60 100+CO ₃	Hefeextrakt	1	60	100	+	-
	PG 100 0 _{VIT} -CO ₃	VL DSMZ 141	5 mL/L	100	-	+	-
Nährstoffbedarf	PG 100 0 _{HE} -CO ₃	Hefeextrakt	0,2	100	-	+	-
	PG 100 0 _{4E} -CO ₃	Ersatzstoffe	je 0,5 g/L	100	-	+	-
	PG 100 0 _{1E} -CO ₃	Ersatzstoffe	1,0	100	-	+	-

3.1.7 MacConkey-Nähragar

Der MacConkey-Nähragar der Firma Carl Roth (Deutschland) ist für die selektive Isolierung und Identifizierung von Enterobakterien bestimmt. Das Medium wurde entsprechend den Herstellerangaben zubereitet und in Form von Festmedium verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3.8 gegeben. Der pH-Wert des Mediums beträgt $7,1 \pm 0,2$.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des MacConkey-Agar der Firma Carl Roth (Deutschland)

Substanz	Menge
Pankreashydrolysat (Pepton) aus Gelatine	17,0 g
Fleisch- und Caseinpepton	3,0 g
Lactose-Monohydrat	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Gallesalze (Cholat)	1,5 g
Neutralrot	30 mg
Kristallviolett	1 mg
Agar-Agar	13,5 g
H ₂ O (deionisiert)	ad 1000 mL

3.1.8 PYX-Medium

Die stoffwechselphysiologische Charakterisierung einiger Gram-positiver Sporen-bildender 1,3-Propandiol-Produzenten wurde in PYX-Medium (P = peptone, Y = yeast extract, X = variables Substrat; (DSMZ, 2011)) durchgeführt. Auf Resazurin wurde verzichtet, um Messungen der optischen Dichte nicht zu beeinträchtigen. Die veränderte Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 3.9 gegeben, die der Salzlösung ist Tabelle 3.10 zu entnehmen. Zur Herstellung des anaeroben PYX-Mediums wurde analog der Herstellung des Mineralsalzmediums verfahren. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (5 mol/L) auf pH 7 eingestellt.

Tabelle 3.9: Adaptierte Zusammensetzung des PYX-Medium DSMZ 104b (DSMZ, 2011)

Substanz	Menge
Trypticase Pepton	5,0 g
Pepton aus Fleisch (Pepsin-verdaut)	5,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
Salzlösung DSMZ 104	40,0 mL
L-Cystein · HCl · H ₂ O	0,5 g
H ₂ O (deionisiert)	ad 1000 mL

Tabelle 3.10: Zusammensetzung der Salzlösung DSMZ 104 (DSMZ, 2011)

Substanz	Menge
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,50 g
K_2HPO_4	1,00 g
KH_2PO_4	1,00 g
NaHCO_3	10,00 g
NaCl	2,00 g
H_2O (deionisiert)	ad 1000 mL

3.2 Methoden der Kultivierung

3.2.1 Kultivierung auf Festmedium

Als Festmedium wurde in der Regel das Standardmedium (Tabelle 3.2) unter Zusatz von 16 g/L Agar-Agar (Merck, Deutschland) verwendet und in Petrischalen gegossen. Fertigung und Inokulation des Festmediums fanden unter aeroben Bedingungen an der sterilen Werkbank (Herasafe Typ HS 18/2, Heraeus Instruments, Deutschland) statt. Die Inkubation wurde in Anaerobier-Töpfen (Dinkelberg Analytics GmbH, Deutschland) durchgeführt. Anaerobe Inkubationsbedingungen wurden durch das Anaerocult A-System der Firma Merck (Deutschland) nach den Herstellerangaben erzeugt. Hierbei handelt es sich um ein Reagenz, welches nach Befeuchtung den vorhandenen Sauerstoff in Kohlendioxid umwandelt. Der Nachweis des anaeroben Milieus erfolgte mittels der Teststreifen Anaerotest (Merck, Deutschland). Inokuliertes Festmedium wurde in der Regel für 2 bis 4 Tage bei 32 °C inkubiert.

3.2.2 Kultivierung in Hungate-Röhrchen

Zur anaeroben Kultivierung außerhalb der Anaerobierbank wurden gläserne Rollrandflaschen verwendet. Diese wurden in der Anaerobierbank (Stickstoffatmosphäre) mit sterilem, sauerstofffreiem Medium gefüllt, mit Butylgummi-Septen verschlossen und mit gelochten Aluminiumkappen gesichert (Abbildung 3.4). Diese von Hungate (1972) entwickelte Methode ermöglicht die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen, wobei Inokulation und Probenahme mittels einer Spritze bei Raumluftatmosphäre erfolgen können. Es wurden unterschiedliche Rollrandflaschen verwendet. Bei einem Gesamtvolumen von 50 mL wurden 30 mL Medium, bei 20 mL Gesamtvolumen 12,5 mL Medium vorgelegt.

Die Inokulation und Beprobung der Hungate-Röhrchen erfolgte an der sterilen Werkbank. Das Medium wurde mittels steriler Spritze und Kanüle mit dem Inokulum beimpft, das Inokulationsvolumen entsprach 5 bis 8 % des Gesamtvolumens. Die Kulturen wurden anschließend im Wasserbad (Typ 1005, GFL, Deutschland) ungeschüttelt bei 32 °C inkubiert.

Die Probenahme erfolgte mittels steriler Spritze und Kanüle. Es wurde 1 mL Zellsuspension entnommen und die Zellen und festen Bestandteile durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 20800 x g (Zentrifuge 5417, Rotor F 45-24-11; Eppendorf, Deutschland) abgetrennt. Der zellfreie Überstand wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

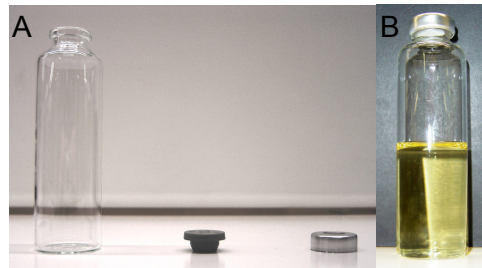


Abbildung 3.4: Aufbau eines Hungate-Röhrchens; (A) Rollrandflasche mit Butylgummi-Septum und Aluminiumkappe, (B) befülltes Hungate-Röhrchen

3.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Einige Versuche wurden im Schüttelkolben-Maßstab durchgeführt. Für Optimierungsversuche wurden die Vorkulturen in 50 mL Rollrandflaschen (vgl. Kapitel 3.2.2) in Mineralsalzmedium mit 25 g/L Pharmaglycerin für 24 h kultiviert. Im Arbeitsraum der Anaerobierbank wurden die Schüttelkolben mit einem Gesamtvolumen von 100 mL mit 45 mL Testmedium befüllt und mit 5 mL Zellsuspension (10 %) beimpft. Die Inkubation der Schüttelkolben erfolgte bei 32 °C im Inkubator der Anaerobierbank (unter Stickstoffatmosphäre). Die Kulturen wurden mit 250 upm gerührt (Variomag Telesystem 15, H+P Labortechnik AG, Deutschland). Als Testmedien wurden Varianten des Standardmediums (vgl. Kapitel 3.1.2) verwendet. Bei einigen Ansätzen wurde steriles Calciumcarbonat in variablen Mengen im Schüttelkolben vorgelegt bevor das sterile Standardmedium hinzugegeben wurde.

Die Versuche erfolgten im Doppelansatz. Zur Probeentnahme wurde unter anaeroben Bedingungen 1 mL Zellsuspension dem Schüttelkolben entnommen. Zellen und feste Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 20800 x g abgetrennt und der zellfreie Überstand bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4 Kultivierung in der 96-Deep-Well-Platte

3.2.4.1 Evaluierung im Mikromaßstab

Die Versuche zur Evaluierung wurden in 96-Deep-Well-Platten (DWP) der Firma Sarstedt (Deutschland) mit runden Wells und einem Well-Volumen von 1,2 mL durchgeführt (Mega-Block 96 Well aus Polypropylen). Die DWP wurde unter anaeroben Bedingungen mit 950 µL sterilem, sauerstofffreiem Medium pro Well befüllt und jedes Well mit 50 µL Zellsuspension (5 %) beimpft.

In manchen Kultivierungen wurde Calciumcarbonat als pH-Puffersubstanz eingesetzt. Um das vorwiegend als Feststoff vorliegende Calciumcarbonat gleichmäßig auf die Wells der DWP zu verteilen, wurde ein Pipettierreservoir mit einer hierfür konstruierten Vorrichtung auf einen Schüttler (MS2 MiniShaker, IKA, Deutschland) montiert. Durch Schüttelbewegungen (4,5 mm Orbit, 600 upm) wurde das Calciumcarbonat so in Suspension gehalten und die Suspension konnte mittels einer Mehrkanalpipette in die Wells der DWP eingebracht werden. Anschließend wurde die DWP mit einer sterilen, gasdurchlässigen Viskose-Folie (Carl Roth, Deutschland), sowie mit dem Polystyroldeckel einer Mikrotiterplatte (Sarstedt, Deutschland) verschlossen und mit Parafilm abgedichtet (Abbildung 3.5).

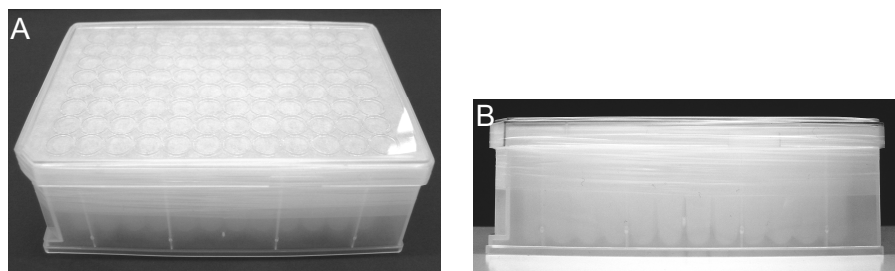


Abbildung 3.5: 96-Deep-Well-Platte (Abmessungen: 128 x 86 x 44 mm, Volumen pro Well: 1,2 mL), verschlossen mit Gasdurchlässiger Folie, Mikrotiterplatten-Deckel und Parafilm; (A) von oben (B) von der Seite

Die DWP wurden im Inkubator der Anaerobierbank bei 32 °C auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (Orbit 2 mm; Thermo Shaker PST-60HLplus, Kisker, Deutschland) mit 350 upm inkubiert. Die Inkubation erfolgte bis zum Abschluss der Reaktion (in der Regel 5 bis 7 d). Anschließend wurde die DWP zentrifugiert (25 min bei 1500 x g; Rotana 46R, Hettich, Deutschland) und es wurden 200 µL zellfreier Überstand in eine Mikrotiterplatte (Gesamtvolumen pro Well: 330 µL) überführt. Analysen wurden sofort im Anschluss durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend mit einer luftdichten Acetatfolie (Sarstedt, Deutschland) verschlossen und bei 4 °C gelagert.

Sollte die Zellsuspension der DWP zur späteren Verwendung erhalten bleiben, wurden lediglich 300 µL Zellsuspension pro Well entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Feste Bestandteile der Kultursuspension wurden durch Zentrifugation (20 min, 3500 x g) abgetrennt und 200 µL des zellfreien Überstandes in eine weitere Mikrotiterplatte überführt. Die Überstände und die Zellsuspension in der DWP wurden bei 4 °C gelagert.

Vorkulturen für die Kolonie-Evaluierung (Anreicherungskultur)

Die Mikroorganismen aus den Anreicherungskulturen wurden ab dem zweiten Screening Durchgang nach einmaliger Vereinzellung auf Festmedium direkt im Mikromaßstab evaluiert. Hierzu wurden DWP unter anaeroben Bedingungen mit 1000 µL Testmedium befüllt. Als Inokulum wurden einzelne Kolonien vom Festmedium direkt in die Wells überimpft. Für folgen-

de Evaluierungsversuche wurde als Inokulum Zellsuspension aus der vorherigen Kultivierung in DWP verwendet. Hierbei handelte es sich in der Regel um eine 5 Tage alte Kultur.

Vorkulturen für die Evaluierung der Reinkulturen

Die Vorkulturen für die Evaluierung der Reinkulturen wurden in 20 mL Hungate-Röhrchen (vgl. Kapitel 3.2.2) in Mineralsalzmedium mit 25 g/L Pharmaglycerin für 16 bis 24 h kultiviert. Für die Vorkulturen der Reinkulturen des dritten Screening-Durchgangs wurde Mineralsalzmedium mit 50 g/L Pharmaglycerin verwendet.

3.2.4.2 Anreicherungskultur im Mikromaßstab

Die Anreicherung im Mikromaßstab wurde in Screening-Durchgang 3 angewendet. Für die Anreicherung wurden DWP mit quadratischen Kavitäten und einem Well-Volumen von 2,2 mL verwendet. Die Proben wurden gemäß Tabelle 3.17 für den Einsatz in DWP vorbereitet. Jede Kultivierung erfolgte pro Medium im Doppelansatz.

Anaerobe Anreicherungskultur

Die Inokulation der Anreicherungskulturen wurde in der Anaerobierbank durchgeführt. Es wurden 200 µL der Probensuspension als Inokulum in die DWP vorgelegt und mit 1800 µL des Screening-Mediums (vgl. Tabelle 3.6) überschichtet. Anschließend wurden die DWP verschlossen (vgl. Abbildung 3.5). Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen ungeschüttelt bei 32 °C für 4 bis 7 Tage.

Die Anreicherungskulturen wurden in der Anaerobierbank überimpft. Sterile DWP wurden mit 1800 µL sterilem, sauerstofffreiem Anreicherungsmedium befüllt, mit 200 µL der Anreicherungskultur (10 %) beimpft und unter den soeben genannten Bedingungen inkubiert.

Anreicherung fakultativ anaerober Mikroorganismen

Für die Anreicherung von Mikroorganismen mit veränderten Sauerstoffanforderungen wurden 150 µL der Probensuspension eingesetzt. Dem Screening-Medium (vgl. Tabelle 3.6) wurden 0,3 % Agar-Agar zugesetzt, um Konvektion zu vermeiden. Die Inokulation der Anreicherungskulturen wurde in der Anaerobierbank durchgeführt. Es wurden 1350 µL anaerobes, temperiertes Medium (T = 40 °C) über das Inokulum geschichtet. Die DWP wurden verschlossen (vgl. 3.2.4). Die Inkubation erfolgte außerhalb der Anaerobierbank unter Raumluftbedingungen bei 32 °C für 4 bis 7 Tage.

Die Anreicherungskulturen wurden unter anaeroben Bedingungen überimpft. 200 µL der durchmischten Anreicherungskultur wurden entnommen und in eine sterile DWP vorgelegt. Anschließend wurde dieses Inokulum mit 1350 µL sterilem, sauerstofffreiem Anreicherungsmedium (0,3 % Agar-Agar) überschichtet und unter den genannten Bedingungen inkubiert.

3.2.5 Herstellung von Dauerkulturen

1,3-Propandiol-produzierende Reinkulturen wurden bei -80 °C eingelagert. Hierfür wurde Zellsuspension der entsprechenden Kultur direkt mit einem Kryoschutzstoff unter der sterilen Werkbank versetzt. Der Schutzstoff dringt in die Zelle ein und stabilisiert dort die Hydrathüllen der Proteine, wodurch die Denaturierung während des Einfrierens verhindert wird.

Gram-positive Reinkulturen wurden in Mineralsalzmedium mit 25 g/L Pharmaglycerin für 20 bis 24 h in 20 mL-Hungate-Röhrchen inkubiert. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit sterilem Pharmaglycerin (zu einer Endkonzentration von 50 % v/v) versetzt. Die Suspension wurde in sterile Kryogefäße (Sarstedt, Deutschland) überführt.

Gram-negative Reinkulturen wurden in Mineralsalzmedium mit 10 g/L Glucose anstelle des Glycerins für 24 h in 20 mL-Hungate-Röhrchen inkubiert. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit einer 10%igen Dimethylsulfoxid-Lösung (zu einer Endkonzentration von 5 % v/v) versetzt. Die Suspension wurde in sterile Kryogefäße überführt.

Diese unterschiedliche Behandlung erwies sich als notwendig, da einige Gram-negative Stämme bei der Verwertung von Glycerin das toxische 3-Hydroxypropionaldehyd im Überstand akkumulierten, was die Regeneration der Stämme aus der Dauerkultur erschwerte (vgl. Kapitel 4.5.2).

3.3 Analytische Methoden

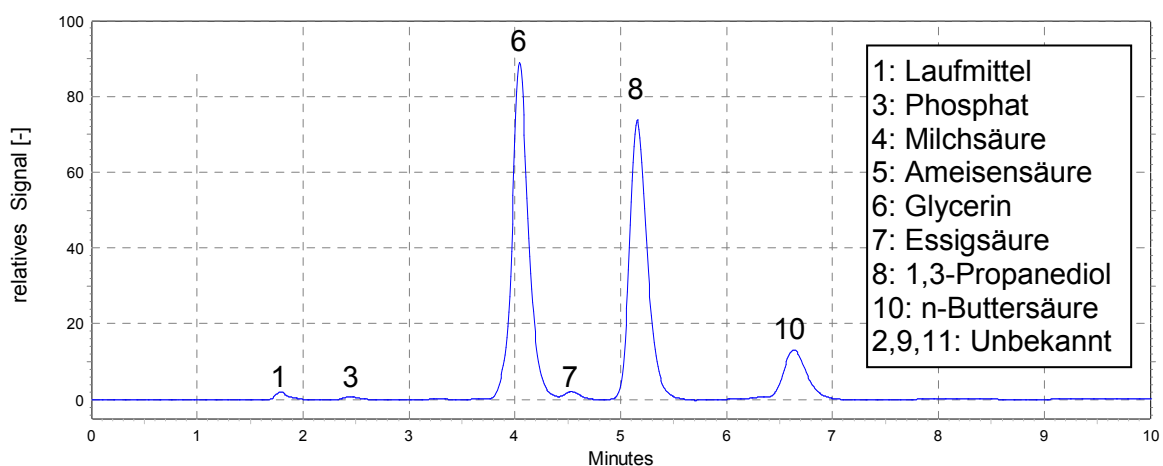
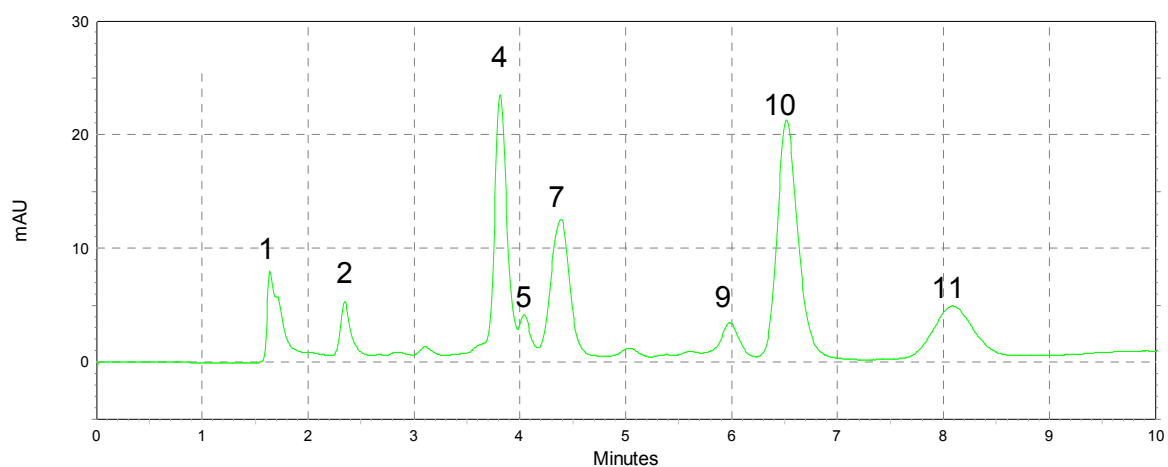
3.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Bestimmung der Edukt- und Produktkonzentrationen im zellfreien Kulturüberstand erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC). Zur Probenvorbereitung wurden 50 µL des zellfreien Kulturüberstandes in 1000 µL Laufmittel (5 mM H₂SO₄ in Reinstwasser angesetzt) verdünnt (Verhältnis 1:21).

Die Detektion erfolgte mit einem UV- und einen RI-Detektor. Die zur analytischen Trennung verwendete Fermentation Monitoring Säule ist halb so lang wie die ursprünglich verwendete Aminex HPX-87H Säule. Dies ermöglichte eine erheblich kürzere Analysezeit, da nicht nur die Trennstrecke verringert ist, sondern zusätzlich mit erhöhter Flussrate getrennt werden kann. Die stationäre Phase besteht aus sulfoniertem Divinylbenzol-Styrol-Copolymer Harz mit 8 % Quervernetzung, welches in Form von Kugeln (Durchmesser 9 µm) vorliegt. Die Systemspezifikationen sind in Tabelle 3.11 dargestellt, typische Chromatogramme sind in Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.11: Geräteliste und Prozessparameter des HPLC-Systems

Systemkomponente	Prozessparameter	Bezeichnung	Hersteller
Eluent	$C_{\text{Eluent}} = 5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$	-	Merck, Deutschland
Degasser	-	Gastorr 102	FloM, Japan
Pumpe	Flussrate: 1 mL/min	LC-10AD	Shimadzu, Deutschland
Autosampler	Probenvolumen: 20 μL bzw. 10 μL	Marathon Basic	Spark Holland, Niederlande
Trennsäule	$T_{\text{Säule}}: 60 \text{ }^\circ\text{C}$	Fermentation Monitoring Column (150 x 7,8mm)	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
UV-Detektor	Wellenlänge: 210 nm	SPD-10A	Shimadzu, Deutschland
RI-Detektor	-	RID-6A	Shimadzu, Deutschland
System-Controller	-	CBM-10A	Shimadzu, Deutschland
Software	-	Class-LC10	Shimadzu, Deutschland

Abbildung 3.6: Chromatogramm (RI-Detektor) des verdünnten Kulturüberstandes (1:21, 20 μL Probeschleife); Inkubation für 5 Tage in DWP, Stamm AKR92a, Pharmaglycerin-Startkonzentration 100 g/LAbbildung 3.7: Chromatogramm (UV-Detektor) des verdünnten Kulturüberstandes (1:21, 20 μL Probeschleife); Inkubation für 5 Tage in DWP, Stamm AKR92a, Pharmaglycerin-Startkonzentration 100 g/L

3.3.2 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert des zellfreien Kulturüberstands wurde bei Raumtemperatur mit dem pH-Meter pH 526 (WTW GmbH, Deutschland) oder der Mikroelektrode InLab Micro (Mettler Toledo, Deutschland) bestimmt.

Der pH-Wert einiger Kultivierungsmedien der Anreicherungsphase (Kultivierungen in DWP) wurde optisch durch Zusatz eines pH-Indikatorfarbstoffes ermittelt (vgl. Tabelle 3.6). Diese Farbstoffe sind sehr schwache Säuren oder Basen, deren undissoziierte Form eine andere Farbe besitzt als das dissoziierte Salz. Der interessierende pH-Bereich 6 bis 7,5 wird durch die in der Mikrobiologie häufig verwendeten pH-Indikatoren Bromthymolblau oder Phenolrot abgedeckt. Da sie dem Kultivierungsmedium zugesetzt werden, können die pH-Indikatoren nur in sehr geringen, nicht-toxischen Konzentrationen verwendet werden. Die Eigenschaften der pH-Indikatoren Phenolrot und Bromthymolblau sind in Tabelle 3.12 dargestellt.

Tabelle 3.12: Eigenschaften der pH-Indikatorfarbstoffe Phenolrot und Bromthymolblau

Eigenschaft	Phenolrot	Bromthymolblau
Farbumschlag	gelb bei pH 6,4 rot bei pH 8,2	gelb bei pH 6,0 blau bei pH 7,6
Absorptionsmaxima	436 nm und 558 nm	433 nm und 618 nm
Konzentration im Medium	20 mg/L	20 mg/L
Bereich der Kalibrierung	pH 5,8 - 7,4	pH 5,8 - 7,4

Die pH-Indikatorfarbstoffe wurden zunächst als Stammlösung (1 g/L) angesetzt. Hierfür wurden 0,1 g des Farbstoffs in Natronlauge (0,1 mol/L) gelöst und anschließend mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Die Stammlösung wurde bei der Bereitung der Medien so eingesetzt, dass eine Endkonzentration von 20 mg/L erreicht wurde. In Medien mit pH-Indikatorzusatz wurde auf den Einsatz des Redoxindikators Resazurin (vgl. Kapitel 3.1.2) verzichtet.

Zunächst wurden Vergleichslösungen mit Phosphatpuffer vermessen und eine Kalibrierung erstellt (vgl. Kapitel 7.4, Abbildung 7.1, Abbildung 7.2, Abbildung 7.3). Hierfür wurden 2 Lösungen hergestellt. Eine Lösung enthielt 0,1 mol/L KH_2PO_4 (13,6 g/L) mit 20 mg/L des pH-Indikatorfarbstoffes und die andere 0,1 mol/L Na_2HPO_4 (14,2 g/L) mit 20 mg/L des pH-Indikatorfarbstoffes. Die zwei pH-Pufferlösungen wurden so vereinigt, dass 11 Farbstofflösungen im Bereich der pH-Werte 5,8 bis 7,8 entstanden (Wirkungsbereich des eingesetzten Phosphatpuffers), wobei sich die pH-Werte um jeweils 0,2 unterschieden. 200 μL dieser Lösung wurden in je 8 Wells einer Mikrotiterplatte (Material: Polystyrol; Sarstedt, Deutschland) gefüllt (Abbildung 3.8) und in dem für Mikrotiterplatten geeigneten Photospektrometer Easy Reader AER 400 (SLT-Labinstruments/Tecan, Deutschland) vermessen. Für die Messung wurde ein Filter mit einer Wellenlänge von 550 nm verwendet. Der für eine Kultivierung im Batch relevante pH-Bereich liegt zwischen 5,8 und 7,4, so dass eine Kalibrierung für die

Punkte in diesem Bereich durchgeführt wurde. Die Kurvenverläufe, sowie die für die Berechnung verwendeten Formeln sind im Anhang (Abbildung 7.1 und Abbildung 7.2) dargestellt.

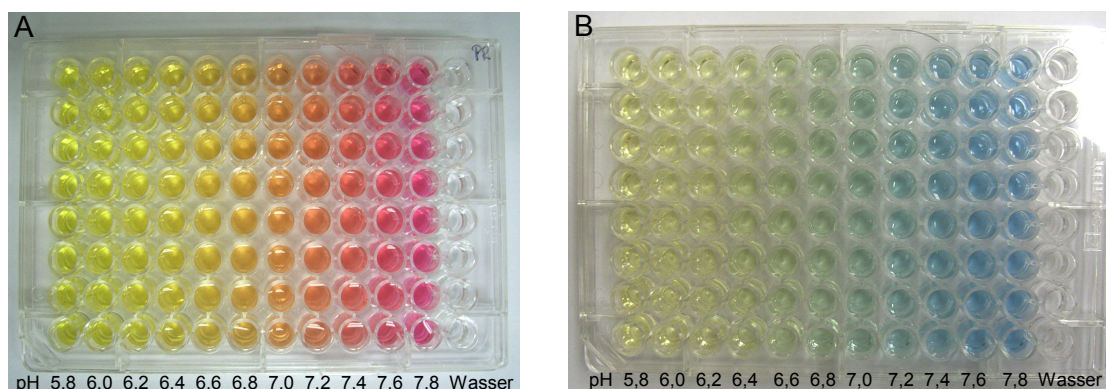


Abbildung 3.8: Mikrotiterplatte mit 20 mg/L Kalibrierungslösungen in 0,1 mol/L Phosphatpuffer bei pH-Werten 5,8 bis 7,8 ; (A) Phenolrot, (B) Bromthymolblau

Zur Bestimmung des pH-Wertes der Kultursuspension wurden 200 μ L des zellfreien Überstandes in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Extinktion der Überstände wurde wie oben beschrieben im Photospektrometer vermessen. Zur Ermittlung der Eigenabsorption des Mediums wurde Medium der gleichen Zusammensetzung jedoch ohne Zusatz des pH-Indikator vermessen.

3.3.3 Kolorimetrische 3-Hydroxypropionaldehyd-Bestimmung

Das Zwischenprodukt 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) wurde mit der modifizierten Methode von Circle et al. (Circle et al., 1945) bestimmt (Krauter et al., 2012).

Hierzu wurden die Proben zu Konzentrationen zwischen 0 bis 500 mM 3-HPA mit Reinstwasser verdünnt. 200 μ L der verdünnten Probe wurden mit 150 μ L Tryptophan-Lösung und 600 μ L 37-prozentiger Salzsäure versetzt. Der Ansatz wurde für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend im Eisbad für 5 min abgekühlt. Die Ansätze wurden bei 560 nm im Photospektrometer T80 UV/VIS vermessen (PG Instruments Ltd., Großbritannien) und die Konzentration über eine bestehende Kalibrierung berechnet.

3.4 Charakterisierung und Identifizierung der Mikroorganismen

Die isolierten Stämme mit positiven Produktionseigenschaften wurden zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen und zur Beurteilung der Pathogenität näher charakterisiert,.

3.4.1 Mikroskopische Untersuchung

Zellmorphologie und Sporenbildung der Anreicherungskulturen, sowie der neu isolierten Stämme wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop (Axioplan; Carl Zeiss AG, Deutschland)

untersucht (Vergrößerung 400-fach bzw. 1000-fach). Die Dokumentation wurde mit der Bildverarbeitungssoftware analySIS 5.0 (Olympus, Deutschland) durchgeführt.

3.4.2 Bestimmung des Gram-Verhaltens

Die Differenzierung zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen wurde standardmäßig mit dem Merck Bactident Aminopeptidase-Test durchgeführt. Der Test basiert auf der Reaktion der L-Alanin-Aminopeptidase, die fast ausschließlich in Gram-negativen Mikroorganismen vorkommt. Das Enzym ist in der Lage L-Alanin aus Peptiden abzuspalten. Der Test nutzt dies, indem als Substrat L-Alanin-4-nitroanalidhydrochlorid verwendet wird, das bei Spaltung das gelb gefärbte 4-Nitroanilin freisetzt.

Um Zellmaterial für die Gram-Bestimmung zu erhalten wurden Festmedium der Standardzusammensetzung (vgl. Kapitel 3.2.1) inokuliert und bebrütet. Eine Einzelkolonie der zu bestimmenden Reinkultur wurde entnommen und in 200 µL sterilem deionisiertem Wasser in einer Küvette suspendiert. Anschließend wurde ein Teststäbchen hinzugegeben und der Ansatz bei 37 °C im Wasserbad (Typ 1002, GFL, Deutschland) inkubiert. Die Färbung der Suspension wurde nach 10 und 30 min kontrolliert. Eine eindeutige Gelbfärbung führte zur Einordnung als Gram-positiv, keine Farbveränderung zu Gram-negativ.

3.4.3 Oxidase-Nachweis

Enterobakterien zeichnen sich durch das Fehlen einer Cytochromoxidase aus. Aus diesem Grund wurden die Gram-negativen Kulturen auf die Existenz der Cytochromoxidase untersucht. Es wurde der Bactident Oxidase-Test (Merck, Deutschland) verwendet. Die Funktion der Cytochromoxidase in der Zellmasse ist es, Cytochrom c zu oxidieren und die Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen. Das Enzym kann jedoch auch andere organische Substanzen als Elektronenakzeptor nutzen. Dieser Test basiert auf der Übertragung der Elektronen auf das NaDi-Reagenz (1-Naphthol und Dimethylparaphenyldiamin), wobei der Farbstoff Indophenolblau entsteht.

Eine Einzelkolonie der zu bestimmenden Kultur wurde mit der Impföse entnommen und auf die Reaktionszone des Teststäbchens, die NaDi-Reagenz enthält, aufgebracht. Nach einer Reaktionszeit von 20 bis 60 s wurde der Test ausgewertet. Eine blaugefärbte Reaktionszone deutet auf einen Cytochromoxidase-positiven, eine farblose auf Cytochromoxidase-negativen Stamm hin.

3.4.4 Wachstum auf MacConkey-Nähragar

Für die Charakterisierung von Gram-negativen Reinkulturen wurde MacConkey-Agar als Fertigmedium verwendet. MacConkey-Agar ist ein differenzierender Nähragar für die Kultivierung von Lactose-verwertenden Enterobakterien. Die Gallelsalze und das Kristallviolett im

Medium hemmen die meisten Gram-positiven Bakterien. Neutralrot dient als pH-Indikator und zur Anfärbung Lactose-verwertender Bakterienkolonien. Nicht-Lactose-Verwerter können mit Pepton wachsen, wobei Ammoniak gebildet wird. Dieses erhöht den pH-Wert, so dass farblose bis bernsteinfarbene Kolonien entstehen.

Die Kolonieformen der 1,3-Propandiol-bildenden Enterobakterien auf MacConkey-Agar sind in Tabelle 3.13 gegeben.

Tabelle 3.13: Kolonieformen 1,3-Propandiol-bildender Enterobakterienarten auf MacConkey-Agar laut Herstellerangaben (Carl Roth, Deutschland)

Mikroorganismus	Kolonieform
<i>Citrobacter freundii</i>	farblos transparent, rot bei Lactose-Fermentation
<i>Enterobacter aerogenes</i>	pink-rot
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	groß, rot, mucoid

Die Festmedien wurden nach der Inokulation mit dem zu untersuchenden Stamm unter aeroben Bedingungen bei 37 °C für 20 bis 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien auf Färbung und Form untersucht.

3.4.5 Identifizierung mittels BD BBL Enterotube II

Gram-negative Reinkulturen, die Cytochromoxidase-negativ waren, wurden der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet. Dies ermöglichte eine einfache Identifikation auf Ebene der Art durch das kommerziell erhältliche Testsystem BBL Enterotube II (BD, USA; Abbildung 3.9). Dieser Test basiert auf 15 biochemischen Reaktionen, welche in Tabelle 3.14 aufgeführt sind. Als Inokulum für den Enterotube wurden Kulturen von dem nichtselektiven Medium MacConkey-Nähragar (vgl. Kapitel 3.4.4) verwendet, die für 24 h aerob bebrütet wurden.



Abbildung 3.9: BD BBL Enterotube II Test-System zur stoffwechselphysiologischen Identifikation von Enterobakterien

Die Anwendung des Enterotube-Testsystems erfolgte nach Herstellerangaben. Hierzu wurde mit dem Inokulationsdraht des Enterotubes eine Einzelkolonie aufgenommen, einmal durch alle Medienkammern gezogen und der Inokulationsdraht wieder zurückgeschoben, so dass er während der Inkubation dort verbleibt. Der Draht hält die anaerobe Umgebung aufrecht, die für die Glucosefermentation und die Decarboxylierung von Lysin und Ornithin notwendig

ist. Für die übrigen Kammern wurde verbesserter Sauerstoffeintritt durch ein Einstechen der Abdeckfolie gewährleistet.

Tabelle 3.14: Biochemische Tests zur Identifizierung von Enterobakterien mit dem BBL Enterotube II (BD, USA)

Nr.	Test	Reaktion	Auswertung
1	Fermentation von Glucose	Säurebildung	pH-Indikatorumschlag
2	Fermentation von Glucose	Gasproduktion	Wachsschicht hebt sich ab
3	Decarboxylierung von Lysin	Kadaverin-Bildung	pH-Indikatorumschlag
4	Decarboxylierung von Ornithin	Putreszin-Bildung	pH-Indikatorumschlag
5	Schwefelwasserstoffproduktion	Eisensulfidpräzipitat	Schwarzfärbung des Mediums
6	Indol-Bildung aus Tryptophan	Kováč-Indol-Reaktion	Bildung von Rosindol (rot)
7	Fermentation von Adonit	Säurebildung	pH-Indikatorumschlag
8	Fermentation von Lactose	Säurebildung	pH-Indikatorumschlag
9	Fermentation von Arabinose	Säurebildung	pH-Indikatorumschlag
10	Fermentation von Sorbit	Säurebildung	pH-Indikatorumschlag
11	Acetoin aus Glucose	Voges Proskauer-Reaktion	Diacetyl+Kreatin (rot)
12	Fermentation von Dulcit	Säurebildung	pH-Indikatorumschlag
13	Desaminierung von Phenylalanin	Phenylbrenztraubensäure	Schwarzfärbung des Mediums
14	Hydrolyse von Harnstoff	Ammoniakbildung	pH-Indikatorumschlag
15	Citratverwertung	Laugenbildung	pH-Indikatorumschlag

3.4.6 Stoffwechselphysiologische Identifizierung

Neu isolierte Stämme, die Endosporen bildeten und zusätzlich Gram-positiv sowie strikt anaerob waren, wurden auf ihre Substratverwertung mit der Methode nach Holdeman und Moore (1977), adaptiert von Biebl (2002), getestet. Die Typstämme *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 und *Clostridium diolis* DSMZ 15410 sowie der gut charakterisierte 1,3-Propandiol-Produzent *Clostridium butyricum* NRRL 1024 (Wittlich, 2001) wurden als Referenz getestet.

Es wurde die Verwertung von 18 Substraten getestet. Stammlösungen der Substrate wurden in PYX-Medium (vgl. Kapitel 3.1.8) angesetzt in Konzentrationen von entweder 50 oder 100 g/L abhängig von der Löslichkeit der Substanz (Tabelle 3.15).

Die Stammlösungen wurden steril filtriert (Spritzenfilter, Porengröße: 0,22 µm) und unter anaeroben Bedingungen in PYX-Medium zu einer Endkonzentration von 10 g/L verdünnt. PYX-Medium ohne Zusatz einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle wurde als Negativkontrolle verwendet.

Die Vorkulturen wurden in 20 mL Rollrandflaschen mit PYX-Medium ohne Zusatz einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle inkubiert (vgl. Kapitel 3.2.2).

Der Test auf Substratverwertung fand im DWP-Maßstab analog zu Kapitel 3.2.4.1 statt. Jedes der 19 Medien wurde pro Stamm im Dreifachansatz untersucht. Die anaerobe Inkubation erfolgte ungeschüttelt bei 32 °C im Inkubator der Anaerobierbank. Die Inkubationsdauer betrug 3 Tage. Vor dem Start und im Anschluss an die Inkubation wurden je 300 µL der Zellsuspension pro Well entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Diese wurde zentrifugiert (25 min bei 3000 x g; Rotana 46R, Hettich, Deutschland) und der zellfreie Überstand abgenommen.

In diesem Test wurde die Säurebildung als Beleg für einen Substratabbau gewertet. Dieser wurde durch Bestimmung des pH-Wertes im zellfreien Überstand vor und nach der Inkubation quantifiziert. Die pH-Wert-Absenkung der Negativkontrolle (ohne Zugabe einer Kohlenstoffquelle) wurde von allen Differenzen abgezogen (Gleichung 3.1). Eine pH-Wert-Änderung < 0,25 wurde als negativ von 0,25 – 0,5 als schwach positiv und > 0,5 als positiv gewertet.

$$\Delta\text{pH} = (\text{pH}_{\text{X}, t=0\text{d}} - \text{pH}_{\text{X}, t=3\text{d}}) - (\text{pH}_{\text{NK}, t=0\text{d}} - \text{pH}_{\text{NK}, t=3\text{d}}) \quad \text{Gleichung 3.1}$$

X: Substrat, NK: Negativkontrolle, t [d]: Inkubationsdauer

Tabelle 3.15: Verwendete Substanzen für den Test auf Substratverwertung

Testsubstrat	Konzentration der Stammlösung [g/L]
Amygdalin	50
D-(+)-Cellobiose	100
D-(+)-Galactose	50
D-(+)-Glucose	100
D-(+)-Trehalose	50
D-(+)-Xylose	100
D-(-)-Salicin	50
D-(+)-Lactose	100
D-(+)-Melibiose	100
Esculin	50
D-(-)-Ribose	100
D-(-)-Mannitol	100
Raffinose	50
D-(-)- / L- (+)-Arabinose	100
D-(-)-Sorbitol	100
Melezitose	50
m-Erythritol	100
m-Inositol	100

3.4.7 Analyse der 16S rDNA

Stämme, die zur wiederholten Fermentation im 1 L-Maßstab eingesetzt werden sollten, wurden zur Identifizierung auf molekulargenetischer Ebene zur Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) geschickt.

Die Identifizierung erfolgte basierend auf einer partiellen 16S rRNA-Analyse. Hierzu wurde gemäß Rainey et al. (1996) die genomische DNA isoliert und mittels PCR die 16S rDNA amplifiziert und aufgereinigt. Die 16S rDNA wurde anschließend mit dem CEQTMDTCS-Quick Start Kit (Beckmann Coulter, USA) sequenziert und elektrophoretisch mit Hilfe des CEQTM8000 Genetic Analysis System analysiert. Anschließend wurde ein Sequenzvergleich mit bekannten 16S rDNA-Gensequenzen von Clostridien durchgeführt.

3.5 Probenherkunft und Probeneinsatz

Die Screening Durchgänge wurden mit natürlichen Proben durchgeführt. Erd- und Kompostproben wurden in der Regel in einer Tiefe von 10 - 20 cm entnommen. Sedimentproben wurden in Ufernähe entnommen. Die verwendeten Proben sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst. Detaillierte Angaben finden sich im Anhang (Herkunft der Umweltproben Tabelle 7.4, Tabelle 7.5, Tabelle 7.6, Tabelle 7.7).

Tabelle 3.16: Charakteristika der zum Screening eingesetzten Proben

Screening Durchgang	Anzahl der Proben	Probenherkunft	Art der Proben
1	2	Deutschland, Indonesien	Erdprobe, Kompost
2	3	Indonesien	Erdproben (Palmölraffinerie)
3 / anaerob	44	Deutschland, Indonesien	Erdproben, Kompost, Mist
3 / aerob	11	Deutschland, Indonesien	Erdproben, Kompost
4	22	Deutschland	Gewässersediment, Kompost, Mist

Die Proben wurden für die Screening-Durchgänge in verschiedenen Endkonzentrationen eingesetzt und zum Teil vorbehandelt. In den Durchgängen 2 und 4 wurden die Proben im Anschluss an die Inokulation des Mediums, jedoch vor der Inkubation, pasteurisiert.

In Screening-Durchgang 3 erfolgte eine Probenvorbehandlung, um die Verteilung auf die Wells einer DWP zu ermöglichen. Die Proben wurden für eine Woche bei ca. 40 °C getrocknet (Trockenschrank UE 400; Memmert, Deutschland), anschließend gesiebt (Porengröße 0,75 – 1,5 mm; abhängig von der Beschaffenheit der Proben) und in anaerober, physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Für die Herstellung der anaeroben, physiologischen Kochsalzlösung wurde NaCl in einer Konzentration von 9 g/L in deionisiertem Wasser gelöst und die Lösung auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurden 0,28 g/L L-Cystein-HCl·H₂O zuge-

setzt. Die Lösung wurde autoklaviert (20 min, 1 bar Überdruck), heiß verschlossen und in der Anaerobierbank gelagert. Die Schritte sind in Tabelle 3.17 zusammengefasst.

Tabelle 3.17: Probeneinsatz und Vorbehandlung

Screening-Durchgang	Probeneinsatz pro Ansatz		Probenvorbehandlung
1	0,5 g in 30 mL	16,7 g/L	- keine
2	1,0 g in 30 mL	33,3 g/L	- pasteurisieren der beimpften Kulturen; 30 min bei 60 °C
3	ca. 0,1 g in 2 mL	50 g/L	- trocknen für 7 d bei 40 °C
			- sieben/homogenisieren
4			- suspendieren in anaerober, physiologische NaCl-Lösung
			- pasteurisieren der Suspension; 30 min bei 60 °C
4	0,25 g in 50 mL	5 g/L	- z.T. pasteurisieren der beimpften Kulturen; 20 min bei 80 °C

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Konventionelles Screening nach 1,3-Propandiol-bildenden Bakterienstämmen

Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung eines Screening-Verfahrens nach industriell nutzbaren 1,3-Propandiol-produzierenden Bakterienstämmen. Für die Entwicklung eines solchen Screening-Verfahrens stellten die in der Literatur beschriebenen Methoden den Ausgangspunkt dar. Als erster Schritt wurde ein Screening-Verfahren mit den Charakteristika eines konventionellen 1,3-Propandiol (1,3-PD) Screenings durchgeführt.

Die einzelnen Schritte des konventionellen Screening-Verfahrens sind in Abbildung 4.1 dargestellt und werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

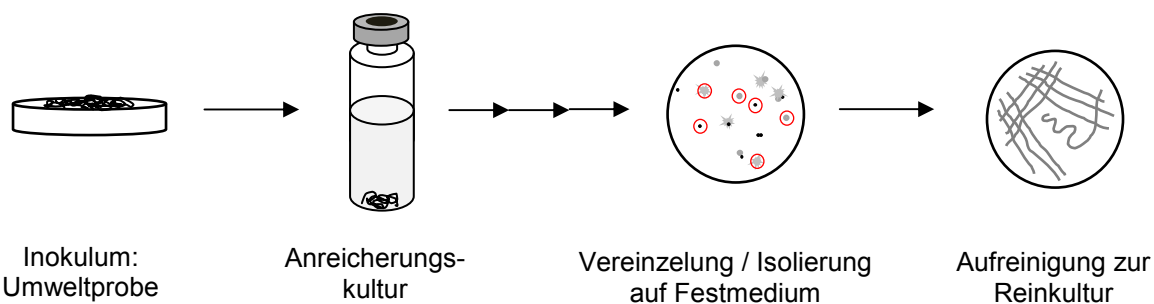


Abbildung 4.1: Schritte des konventionellen 1,3-Propandiol Screening-Verfahrens

4.1.1 Anreicherungsstrategie

Die konventionelle Anreicherungsstrategie war zunächst auf anaerobe, Glycerin-verwertende Bakterienstämme ausgelegt (vgl. Kapitel 2.3.2). Die Anreicherung wurde unter anaeroben Bedingungen im mesophilen Temperaturbereich durchgeführt. Es wurde ein Mineralsalzmedium mit niedrigen Konzentrationen an Hefeextrakt und Glycerin verwendet. Die Produktionsstämme sollten ebenfalls Rohglycerin als preisgünstiges Fermentationssubstrat verwerten können. Deshalb wurde alternativ Rohglycerin in der Anreicherungsphase eingesetzt, um zu ermitteln, ob so Stämme mit höherer Rohglycerin-Toleranz isoliert werden können. Die Anreicherungsbedingungen des konventionellen Screening-Verfahrens sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Es wurden zwei Umweltproben verwendet, um den Einfluss der Probenherkunft auf den Erfolg des Screening-Verfahrens zu beurteilen. Zum einen wurde Kompost einer Palmölplantage verwendet, welcher seit 4 Jahren bei 4 °C lagerte. Palmölkompst enthält Fette und deren Abbauprodukte, so dass neben einer natürlich hohen Bakteriendichte eine Vorselektion auf Glycerin-Verwerter und Fettsäure-tolerante Stämme vorliegt. Zum anderen wurde als Um-

weltprobe Waldboden verwendet, der ungezielt auf dem Gelände des vTI entnommen wurde. Waldboden weist hohe Bakteriendichten auf (Zelldichte ins Böden ca. 10^{11} cm^{-3} (Overmann, 2006)), doch ist die Menge der natürlich vorliegenden Fette bzw. des Glycerin gering.

Tabelle 4.1: Anreicherungsbedingungen der konventionellen Anreicherungsstrategie

Parameter	Anreicherungsbedingungen
Anreicherungsmaßstab	50 mL Hungate-Röhrchen, 30 mL Arbeitsvolumen (Kapitel 3.2.2)
Temperatur	32°C
Durchmischung	unbewegte Suspensionskultur
Sauerstoffbedingungen	anaerob (Stickstoffatmosphäre)
Inokulum	Umweltprobe
Probenmaterial	Palmölkompst, Waldboden
Vorbehandlung	Keine
Probenkonzentration	16,7 g/L
Anreicherungsmedium	Mineralsalzmedium (Kapitel 3.1.2)
Hefeextraktgehalt	1 g/L
Glycerin-Qualität	Pharmaglycerin (PG) bzw. Rohglycerin (RG) Charge1; (Kapitel 3.1.4)
Glycerin-Gehalt	5, 10, 15 g/L; in der 2. Kultur z. T. 50 g/L

Die Anreicherungskultur wurde im Doppelansatz inkubiert. Nach ca. 1 Woche erfolgte einmalig die Übertragung bewachsener Kulturen auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung. Die Anreicherungsmedien enthielten Glycerin-Konzentrationen im Bereich von 5 bis 15 g/L. In der zweiten Kultur kam neben den niedrig konzentrierten Anreicherungsmedien zusätzlich Mineralsalzmedium mit 50 g/L Glycerin zum Einsatz (Abbildung 4.2). Dies sollte eine genaue Beurteilung der Produktionseigenschaften erlauben und überprüfen, ob die höhere Edukt-Konzentration Einfluss auf die Toleranz der Isolate gegenüber dem Edukt hat.

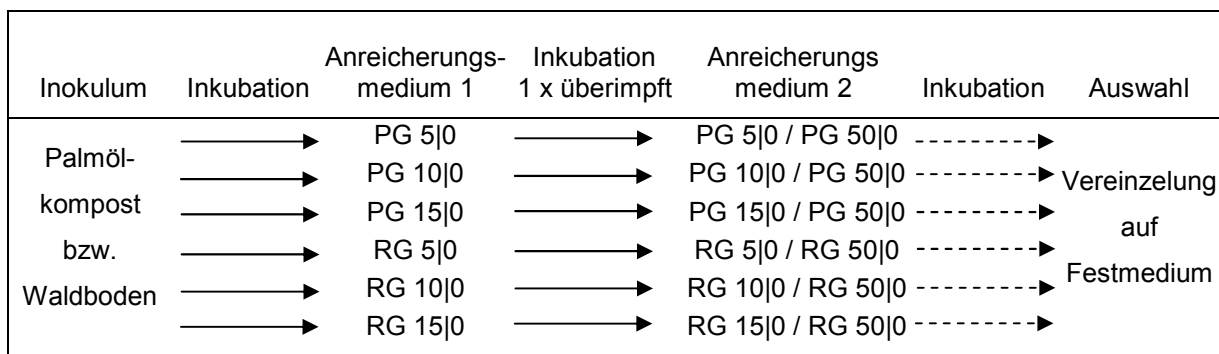


Abbildung 4.2: Schematischer Verlauf des konventionellen Screenings – Medienabkürzung vgl. Kapitel 3.1.6

Jede der zwei Umweltproben wurde in allen Medienkombinationen angereichert. Nach der zweiten Anreicherung erfolgten die Vereinzelung und Isolierung der 1,3-Propandiol-bildenden Bakterienstämme. Die 1,3-Propandiol-bildenden Kulturen wurden im Anschluss an die zweite Anreicherung mittels HPLC ermittelt. Eine Übersicht ist in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 gegeben.

Bei geringen Glycerin-Konzentrationen (5 und 10 g/L) erfolgte in der Regel ein vollständiger Umsatz des Substrates. Diese Konzentrationen waren damit zu niedrig gewählt, um die Produktbildung einschätzen zu können. Auch bei einer Konzentration von 15 g/L kam es bei ca. 50 % der Kulturen zu einer Substratlimitierung. Daher wurde bereits in der zweiten Anreicherungskultur die Konzentration z. T. auf 50 g/L Glycerin erhöht, wobei hier das Substrat nicht komplett umgesetzt wurde.

Tabelle 4.2: Übersicht über die mit Palmölkompost beimpften Anreicherungskulturen - Kultivierungshergang und Ergebnisse der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung im Hungate-Röhrchen (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt); grau hinterlegt: ausgewählte Kulturen zur Aufreinigung

Nr.	Anreicherungs-kultur 1	Anreicherungs-kultur 2	Ergebnisse der Anreicherungskultur 2			
			pH-Wert	Glycerin-Verbrauch [g/L]	C _{1,3-PD} [g/L]	Ausbeute [g/g]
1-1	PG 5 0	PG 5 0	6,38	5,2	1,4	0,28
1-2	PG 5 0	PG 5 0	6,57	5,2	2,2	0,43
1-3	PG 10 0	PG 10 0	5,11	10,5	2,4	0,23
1-4	PG 10 0	PG 10 0	n. b.*	-	-	-
1-5	PG 15 0	PG 15 0	4,84	13,5	3,4	0,25
1-6	PG 15 0	PG 15 0	4,89	14,0	4,0	0,29
1-7	PG 5 0	PG 50 0	n. b.	-	-	-
1-8	PG 10 0	PG 50 0	n. b.	-	-	-
1-9	PG 15 0	PG 50 0	5,00	28,6	16,0	0,56
1-10	PG 15 0	PG 50 0	4,87	14,4	5,7	0,39
1-11	RG 5 0	RG 5 0	6,85	4,7	2,1	0,46
1-12	RG 5 0	RG 5 0	6,70	4,9	2,6	0,53
1-13	RG 10 0	RG 10 0	6,27	10,2	4,5	0,44
1-14	RG 10 0	RG 10 0	6,41	10,2	4,6	0,45
1-15	RG 15 0	RG 15 0	5,03	14,6	5,8	0,40
1-16	RG 15 0	RG 15 0	6,69	6,0	2,6	0,43
1-17	RG 5 0	RG 50 0	4,97	23,4	11,4	0,49
1-18	RG 10 0	RG 50 0	4,99	26,2	11,4	0,43
1-19	RG 15 0	RG 50 0	n. b.	-	-	-
1-20	RG 15 0	RG 50 0	n. b.	-	-	-

*n. b.: nicht bewachsen

Tabelle 4.3: Übersicht über die mit Waldboden beimpften Anreicherungskulturen - Kultivierungshergang und Ergebnisse der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung im Hungate-Röhrchen (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt) grau hinterlegt: ausgewählte Kulturen zur Aufreinigung

Nr.	Anreicherungs- medium 1	Anreicherungs- medium 2	Ergebnisse der Anreicherungskultur 2			
			pH-Wert	Glycerin- Verbrauch [g/L]	C _{1,3-PD} [g/L]	Ausbeute [g/g]
1-21	PG 5	PG 5 0	6,51	5,2	0,6	0,12
1-22	PG 5	PG 5 0	n. b.*	-	-	-
1-23	PG 10	PG 10 0	6,18	10,5	3,1	0,29
1-24	PG 10	PG 10 0	6,25	10,5	1,7	0,16
1-25	PG 15	PG 15 0	6,29	9,7	2,2	0,22
1-26	PG 15	PG 15 0	5,96	15,8	6,4	0,40
1-27	PG 5	PG 50 0	6,10	10,9	1,2	0,11
1-28	PG 10	PG 50 0	5,00	20,3	5,0	0,25
1-29	PG 15	PG 50 0	5,04	18,9	6,1	0,32
1-30	PG 15	PG 50 0	5,41	25,3	10,2	0,41
1-31	RG 5	RG 5 0	6,44	4,9	1,6	0,33
1-32	RG 5	RG 5 0	6,51	4,9	1,3	0,27
1-33	RG 10	RG 10 0	6,61	6,2	0,8	0,12
1-34	RG 10	RG 10 0	6,18	9,7	4,4	0,46
1-35	RG 15	RG 15 0	5,69	13,2	4,5	0,34
1-36	RG 15	RG 15 0	5,61	14,6	4,1	0,28
1-37	RG 5	RG 50 0	5,76	17,5	1,4	0,08
1-38	RG 10	RG 50 0	6,58	3,2	0,0	0,00
1-39	RG 15	RG 50 0	5,44	15,4	5,2	0,34
1-40	RG 15	RG 50 0	5,69	14,2	4,8	0,34

*n. b.: nicht bewachsen

Der höchste Glycerin-Verbrauch wurde bei einer Anreicherung des Palmölkompsts (Nr. 1-9) mit Pharmaglycerin erzielt und lag bei 28,6 g/L bei einer 1,3-Propandiol-Bildung von 16 g/L. Ein eindeutiger Unterschied zwischen der Produktbildung aus den Substraten Pharma- und Rohglycerin wurde bei den hier eingesetzten niedrigen Konzentrationen nicht festgestellt. Insgesamt erzielten Anreicherungskulturen mit Palmölkompst bessere Ergebnisse (1,4 – 16 g/L 1,3-Propandiol; vgl. Tabelle 4.2) als diejenigen mit der Waldboden-Probe (0,6 – 10,2 g/L 1,3-Propandiol, Tabelle 4.3). 85 % der Kulturen, die mit Palmölkompst beimpft wurden, bildeten mehr als 2 g/L 1,3-Propandiol, mit Waldboden als Inokulum waren es nur 55 %. Dieser Trend betrifft ebenfalls die Ausbeute an 1,3-Propandiol. Mehr als 0,4 g/g konnten bei 50 % der Anreicherungskulturen mit Palmölkompst erzielt werden, mit Waldboden als Inokulum waren es 15 %.

Eine Verwendung einer Glycerin-Konzentration von mindestens 15 g/L in der Anreicherungsphase ist somit sinnvoll, um die 1,3-Propandiol-Bildung einschätzen zu können.

Ebenfalls wird die Bedeutung der Umweltprobe deutlich. Die Umweltprobe Palmölkompst, bei der natürliche Vorselektion durch Anwesenheit pflanzlicher Fette bzw. deren Abbauprodukte vorlag, zeigte bessere Ergebnisse als die ungezielt genommene Waldbodenprobe.

4.1.2 Vereinzeln, Isolierung und Charakterisierung

An die Anreicherungsphase schließt sich im konventionellen Screening-Verfahren zunächst die Aufreinigung der angereicherten Mikroorganismen an (vgl. Abbildung 4.1). Auf Grund der großen Anzahl an 1,3-Propandiol-haltigen Anreicherungskulturen wurde unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien eine Auswahl zur Vereinzeln getroffen. Zu diesen Kriterien gehörten hohe Produkt-Konzentrationen, Ausbeuten, die Verwertung von Rohglycerin und Wachstum bei hohen Edukt-Konzentrationen. Die für die Vereinzeln ausgewählten Anreicherungskulturen sind in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 grau hinterlegt.

Die Kulturen wurden im Anschluss auf Festmedium, durch Ausstreichen in fallender Reihe, vereinzelt. Die Kultursuspension der Anreicherungskulturen mit 50 g/L Glycerin-Startkonzentration (1-9, 1-17 und 1-18) wurden pasteurisiert sowie unbehandelt verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von 1 Woche wurden 33 einzelnstehende Kolonien ausgewählt und erneut ausgestrichen. Anschließend wurden die Kulturen zum beimpfen von Flüssigmedium verwendet. Um die Verwertung von Rohglycerin beurteilen zu können, wurden die Kulturen in Hungate-Röhrchen mit Mineralsalzmedium mit je 50 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin kultiviert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)

Stamm	Herkunft aus Anreicherung	Pharmaglycerin			Rohglycerin		
		pH-Wert-Änderung	C _{1,3-PD} [g/L]	Ausbeute [g/g]	pH-Wert-Änderung	C _{1,3-PD} [g/L]	Ausbeute [g/g]
AKR3	1-12	0,76	0,3	-	1,10	0,1	-
AKR5	1-12	0,61	0,0	-	0,26	0,1	-
AKR9	1-9	0,31	0,0	-	2,18	12,2	0,44
AKR10	1-9	1,57	6,6	0,33	n. b.	-	-
AKR11	1-9	1,84	0,5	-	1,77	0,2	-
AKR12	1-9	2,26	10,5	0,40	2,16	8,1	0,38
AKR14	1-18	2,40	7,7	0,35	2,20	5,5	0,32
AKR16	1-18	2,33	9,7	0,38	n. b.	-	-
AKR17	1-17	2,22	14,7	0,43	2,13	13,7	0,43
AKR20	1-17	2,27	5,5	0,31	2,20	5,3	0,32
AKR21	1-9 - pasteurisiert	1,43	0,4	-	1,71	0,2	-
AKR28	1-17 - pasteurisiert	2,30	11,5	0,41	2,16	7,0	0,38
AKR29	1-18 - pasteurisiert	2,32	5,5	0,30	2,18	5,2	0,30
AKR32	1-18 - pasteurisiert	0,79	1,7	-	0,42	0,0	-

Nach 7 d zeigten 14 Isolate (42 %) mit mindestens einer der beiden Kohlenstoffquellen Bewuchs und eine pH-Wert-Absenkung von über 0,5. Alle 14 Stämme wurden aus der Palmölkompostprobe isoliert. Neun Stämme bildeten mehr als 2 g/L 1,3-Propandiol, wobei alle aus Kulturen stammten, bei denen in der zweiten Kultur eine Glycerin-Konzentration von 50 g/L eingesetzt wurde. Sechs der Isolate wuchsen sowohl mit Pharma- als auch Rohglycerin, zwei zunächst nur mit Pharmaglycerin und ein Isolat nur mit Rohglycerin.

AKR17 bildete mit 14,7 g/L 1,3-Propandiol aus Pharmaglycerin und 13,7 g/L aus Rohglycerin die höchsten Produktkonzentrationen und wies, neben AKR9, die höchste gemessene Ausbeute auf (0,43 bzw. 0,44 /g). Die beiden in der Literatur beschriebenen 1,3-Propandiol-Produzenten *Clostridium butyricum* und *Klebsiella pneumoniae* können maximal eine Ausbeute von 0,72 mol/mol (0,60 g/g) erreichen (vgl. Kapitel 2.2.7). Die hier vorliegenden Ausbeuten waren deutlich geringer. Eine geringe Ausbeute lässt auf die vermehrte Bildung von Nebenprodukten schließen. Dies kann durch Stammeigenschaften begründet sein. Auch ist es möglich, dass einige der Isolate noch keine Reinkulturen sind, da nur zwei Vereinzlungen zur Aufreinigung durchgeführt wurden. Eine Evaluierung und Charakterisierung in Form eines sekundären Screenings ist notwendig, um die Stammeigenschaften zu klären.

4.1.3 Evaluierung der Produktionseigenschaften und Charakterisierung der Isolate

Die Isolate aus dem konventionellen Screening müssen nun in einem sekundären Screening auf ihre Produktionseigenschaften getestet werden (vgl. Kapitel 2.1.5). Wie häufig in der Literatur beschrieben, wurde das sekundäre Screening in Batch-Versuchen ohne pH-Regelung (Hungate-Röhrchen, 50 g/L Pharmaglycerin) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Flüssigmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)

Stamm	pH-Wert [-]	pH-Wert- Änderung	C _{1,3-PD} [g/L]	Ausbeute [g/g]
AKR9	5,07 ± 0,02	2,26	13,8 ± 0,8	0,58
AKR10	5,86 ± 0,02	1,48	11,6 ± 0,1	0,55
AKR12	5,13 ± 0,01	2,21	15,3 ± 0,9	0,58
AKR14	4,96 ± 0,01	2,38	13,8 ± 0,2	0,61
AKR16	5,09 ± 0,01	2,24	14,7 ± 0,1	0,57
AKR17	5,10 ± 0,03	2,23	16,1 ± 0,9	0,54
AKR20	5,18 ± 0,02	2,15	16,0 ± 0,9	0,51
AKR28	5,14 ± 0,06	2,20	13,0 ± 2,4	0,58
AKR29	5,16 ± 0,02	2,18	12,9 ± 2,0	0,58

Alle Kulturen waren in der Lage das vorgelegte Pharmaglycerin zu verwerten, ein vollständiger Umsatz fand jedoch in keiner der Kultivierungen statt. Die pH-Werte sanken am Ende der Kultivierung auf Werte zwischen pH 5 und 6 ab. Als Nebenprodukte wurden hauptsächlich Essig- und n-Buttersäure gebildet. 1,3-Propandiol-bildende Clostridien bilden ebenfalls diese Nebenprodukte und sind bei einem pH-Wert von 5 bereits in ihrem Wachstum gehemmt (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Falls diese Mikroorganismen hier vorliegen ist es somit wahrscheinlich, dass ein vorzeitiger Abbruch der 1,3-Propandiol-Produktion auf Grund des niedrigen pH-Wertes stattgefunden hat. Die 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen sind als Folge gering und liegen in einem engen Konzentrationsbereich (12,9 – 16,1 g/L). Auch die Ausbeuten liegen nahe beieinander (0,51 - 0,61 g/g). Die Auswahl eines Produktionsstammes wird hierdurch erschwert. Die Stämme AKR12, AKR17 und AKR20 erreichten die höchsten Endkonzentrationen (> 15 g/L).

Ein weiteres Kriterium für eine Stammauswahl stellte die Verwertung von Rohglycerin als Substrat dar. Um diese beurteilen zu können, wurden Batch-Kultivierungen ohne pH-Regulierung unter Verwendung von Rohglycerin der Charge 1 durchgeführt. Die prozentuale Rohglycerin-Toleranz wurde nach Gleichung 4.1 berechnet.

$$\text{Rohglycerin-Toleranz} = \left(\frac{1,3\text{-Propandiol-Bildung}_{\text{Rohglycerin}}}{1,3\text{-Propandiol-Bildung}_{\text{Pharmaglycerin}}} \right) \times 100 \quad \text{Gleichung 4.1}$$

Die prozentuale Rohglycerin-Toleranz bezogen auf die 1,3-Propandiol-Bildung ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

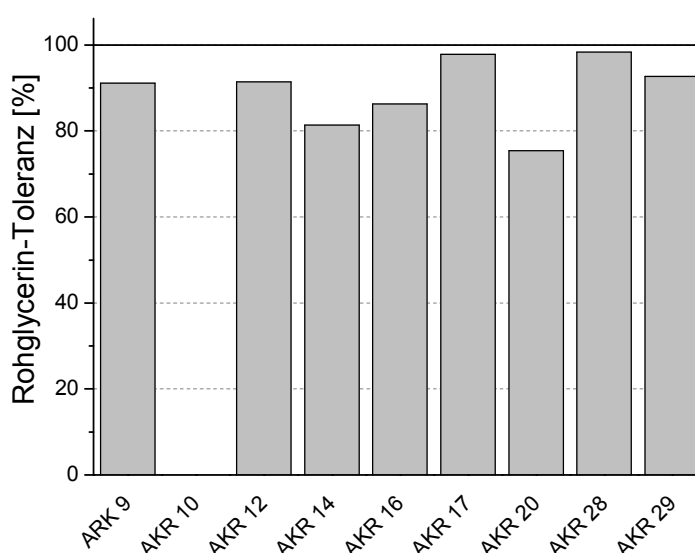


Abbildung 4.3: Rohglycerin-Toleranz der Stämme des konventionellen Screenings nach 7 d Kultivierung (Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)

Acht der neun Stämme konnten das Rohglycerin verwerten. Die Rohglycerin-Toleranz der übrigen Isolate liegt im Bereich von 75 - 98 %. Die Stämme AKR9, AKR12, AKR17, AKR28 und AKR29 zeigten unter gegebenen Bedingungen eine Rohglycerin-Toleranz von über 90 %. Um bei einer Ausbeute von 0,5 g/g eine Endkonzentration von 80 g/L 1,3-Propandiol zu erreichen, ab der die Produktaufreinigung wirtschaftlich wird (Angabe Projektpartner Fraunhofer ICT), müssten 160 g/L Rohglycerin eingesetzt werden. Die hier verwendete Konzentration ist somit vergleichsweise niedrig gewählt. Nur der Stamm AKR10 zeigte mit der eingesetzten Rohglycerin-Konzentration und -Qualität keine Produktbildung. AKR10 stammt aus einer Anreicherungskultur in der Pharmaglycerin als Substrat verwendet wurde.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei allen Stämmen um Sporenbildende Stäbchen handelte. Die isolierten Stämme stammten alle aus Anreicherungskulturen der Umweltprobe Palmölkompst, jedoch wurden nur AKR28 und AKR29 nach Pasteurisierung der Kultursuspension isoliert, die anderen Isolate entstammten Anreicherungskulturen ohne Vorbehandlung. Dass alle Isolate Sporen bildeten kann einerseits auf das Alter der verwendeten Probe zurückgeführt werden. Diese wurde bereits sehr lange gekühlt unter Sauerstoffeinfluss gelagert. Die Anwesenheit von vegetativen strikt anaeroben Zellen ist somit eher unwahrscheinlich. Endosporen bleiben jedoch weitgehend unbeeinflusst durch die Lagerung (vgl. Kapitel 2.1.2). Andererseits wurden die Anreicherungskulturen für 7 d inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt herrschten bereits wachstumshemmende Bedingungen, so dass die Bildung von Endosporen fortgeschritten war und vegetative Zellen zumeist abgestorben waren. Bei Clostridien, zu denen viele in der Literatur beschriebene 1,3-Propandiol-Produzenten gehören, wird Sporenbildung durch Faktoren wie Substrat- oder Nährstoffmangel, unvorteilhafte Wachstumsbedingungen (pH-, Temperatur-, Sauerstoffbedingungen) und das Einsetzen der stationären Phase (verringerte Wachstumsrate) ausgelöst (Mitchell, 2001). Die Ergebnisse der Evaluierung sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst:

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des konventionellen Screening-Verfahrens

Stammbezeichnung	1,3-PD-Produktion aus Pharmaglycerin	Rohglycerin-Toleranz	Sporenbildung	Einstufung als Produktionsstamm
AKR9	+	+++	positiv	geeignet
AKR10	+	-	positiv	ungeeignet
AKR12	++	+++	positiv	sehr geeignet
AKR14	+	++	positiv	evtl. geeignet
AKR16	+	++	positiv	evtl. geeignet
AKR17	++	+++	positiv	sehr geeignet
AKR20	++	+	positiv	evtl. geeignet
AKR28	+	+++	positiv	geeignet
AKR29	+	+++	positiv	geeignet

- schlecht; + gut; ++ sehr gut; +++ hervorragend

1,3-PD-Endkonzentration (50 g/L Pharmaglycerin): + = 2 – 15 g/L; ++ > 15 g/L

Rohglycerin-Toleranz: - < 70 %; + ≥ 70 %; ++ ≥ 80 %; +++ ≥ 90 %

Die Kategorie-Bereiche der Rohglycerin-Toleranz basieren auf der Annahme, dass ein Produktionsstamm bis zu 100 g/L 1,3-Propandiol mit Pharmaglycerin erreichen soll. Ein solcher Stamm mit guter Rohglycerin-Toleranz könnte somit 70 bis 80 g/L, ein Stamm mit sehr guter Toleranz 80 bis 90 und ein Stamm mit hervorragender Toleranz 90 bis 100 g/L 1,3-Propandiol erreichen. Da die hier eingesetzten Rohglycerin-Konzentrationen jedoch deutlich unter denen liegen, die für diese Produktkonzentrationen notwendig wären, sind die Toleranzwerte nur als Trend anzusehen.

Die Stämme AKR9, AKR28 und AKR29 zeigten in dieser Evaluierung gute Produktionseigenschaften. AKR12 und AKR17 zeigten sehr gute Eigenschaften und wurden erneut auf ihre Reinheit überprüft. Der Stamm AKR17 musste im Zuge dieser Untersuchung erneut vereinzelt werden, da zwei unterschiedliche Kolonieformen auf Festmedium (Mineralsalzmedium Standardzusammensetzung) anwesend waren. Die daraus hervorgegangenen Stämme wurden als AKR17a, AKR17b bezeichnet.

Durch die rasche pH-Wert-Absenkung während der Kultivierung (vgl. Kapitel 4.2.1) und die geringen Rohglycerin-Konzentrationen ist eine eindeutige Aussage über den besten 1,3-Propandiol-Produzenten nicht möglich. Die positiv bewerteten Stämme müssen daher im pH-geregelten Bioreaktor genauer untersucht werden (Wilkens, 2012).

4.1.4 Zusammenfassung – Konventionelles Screening-Verfahren

Ziel des konventionellen Screenings war die Anreicherung anaerober Glycerin-verwertender Bakterienstämme und Isolierung derjenigen Mikroorganismen, die 1,3-Propandiol produzieren. Von insgesamt 33 Bakterienstämmen, die anaerob auf Festmedium kultiviert werden konnten, bildeten lediglich neun in Flüssigmedium 1,3-Propandiol aus Glycerin. Fünf weitere Reinkulturen zeigten Wachstum in Flüssigmedium, bildeten jedoch kein 1,3-Propandiol. Eine selektivere Anreicherung von 1,3-Propandiol-bildenden Mikroorganismen ist somit ebenso anzustreben, wie eine gezieltere Aufreinigung der Produktionsstämme.

Der Einfluss der Umweltprobe auf den Ausgang des Screening-Verfahrens wurde ebenso deutlich. Bei der Umweltprobe Palmölkompost, bei der bereits eine natürliche, standortbedingte Anreicherung stattgefunden hatte, wurden in der Anreicherungsphase insgesamt höhere Produktkonzentrationen und bessere Ausbeuten erzielt als bei der ungezielt genommenen Waldbodenprobe. Alle 1,3-Propandiol-bildenden Reinkulturen entstammten der Palmölkompost-Probe. Zudem wurden ausschließlich Sporen-bildende Mikroorganismen isoliert, was auf die lange Lagerung zurückzuführen ist. Dies verdeutlicht die Bedeutung des zeitnahen Einsatzes einer Umweltprobe für die Isolierung empfindlicher Mikroorganismen.

Als Kohlenstoffquelle wurde in der Anreicherung Glycerin eingesetzt. Eine Glycerin-Konzentration von mindestens 15 g/L in der Anreicherungsphase erwies sich als sinnvoll, da bei niedrigeren Konzentrationen Substratlimitierung auftrat. Zudem sind alle 1,3-Propandiol-

produzierenden Reinkulturen aus Anreicherungskulturen mit hohen Glycerinkonzentrationen isoliert worden. Die Qualität des Substrates ist hier ebenfalls von Bedeutung. Acht der neun Stämme konnten das eingesetzte Rohglycerin mit einer Toleranz über 70 % verwerten. Der Stamm AKR10, der aus einer Anreicherung mit Pharmaglycerin stammte, war dagegen komplett gehemmt. Für einen Einsatz im Fed-Batch Reaktor müsste ca. die dreifache Rohglycerin-Menge, die in der Evaluierung eingesetzt wurde, verwendet werden um wirtschaftliche 1,3-Propandiol-Konzentration zu erreichen. Um die zeitaufwendige Aufreinigung ungeeigneter Stämme zu verhindern, sollte ausschließlich Rohglycerin, in möglichst hohen Konzentrationen, in der Anreicherungsphase eingesetzt werden.

Eine Evaluierung der Produktionsstämme konnte nur eingeschränkt durchgeführt werden. Durch die hohe Anzahl zu untersuchender Stämme und die umständliche Versuchsdurchführung in Hungate-Röhrchen war die Anzahl der Evaluierungsparameter stark begrenzt. Zudem zeigte die Analyse, dass die pH-Werte der Isolate bereits bei geringen Produktkonzentrationen auf einen für die meisten 1,3-Propandiol-bildenden Mikroorganismen toxischen Wert abgesunken sind. Der vorzeitige Abbruch der Produktionsphase erschwert die Beurteilung und den Vergleich der isolierten Stämme erheblich.

4.2 Implementierung einer Hochdurchsatz-Strategie in der Evaluierungsphase

Die Beurteilung der isolierten Stämme des konventionellen Screening-Verfahrens war maßgeblich durch zwei Probleme behindert. Einerseits waren die maximal erreichbaren Produktkonzentrationen durch die gewählten Kultivierungsbedingungen begrenzt, so dass ein Stammvergleich nur bedingt möglich war. Andererseits brachte der verwendete Maßstab, die Kultivierung in Hungate-Röhrchen, einen hohen Zeit-, Platz- und Materialaufwand mit sich und erschwert so die schnelle Evaluierung der isolierten Stämme.

Das Ziel einer Optimierung der Evaluierungsphase ist somit die Implementierung verbesserter Kultivierungsbedingungen für höhere Produktkonzentrationen und ein Scale-down für die schnelle, detaillierte Evaluierung im Vorfeld einer Fermentationsoptimierung. Die hier optimierten Evaluierungsbedingungen finden vorwiegend bei der Evaluierung der Reinkulturen in Kapitel 4.5 Anwendung.

4.2.1 Variation des pH-Puffersystems

Ein Problem des Standard Kultivierungsmediums in der Evaluierung ist die begrenzte Kapazität der pH-Pufferung. Werden organische Säuren als Nebenprodukte gebildet, kommt es zu einer raschen Abnahme des pH-Wertes, so dass dieser außerhalb des Wachstums- bzw. Produktionsoptimums liegt. Als Folge wird die Produktionsphase frühzeitig abgebrochen oder

die Zusammensetzung der Produkte verändert sich (vgl. Kapitel 2.1.4). Diese Absenkung ist abhängig von der Menge und der Stärke der gebildeten Säuren (vgl. Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: pKs-Werte einiger organischer Säuren, die als Nebenprodukte der Glycerin-Verwertung entstehen (vgl. Abbildung 2.4) (Lide, 2004; Beyer et al., 2004)

Organische Säure	Summenformel	Molmasse [g/mol]	pKs ₁	pKs ₂
Ameisensäure (Methansäure)	CH ₂ O ₂	46,02	3,74	-
Milchsäure (2-Hydroxypropansäure)	C ₃ H ₆ O ₃	96,08	3,86	-
Bernsteinsäure (Butandisäure)	C ₄ H ₆ O ₄	118,09	4,21	5,64
Essigsäure (Ethansäure)	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	4,76	-
n-Buttersäure (Butansäure)	C ₄ H ₈ O ₂	88,10	4,82	-
Propionsäure (Propansäure)	C ₃ H ₆ O ₂	74,08	4,87	-

Die unter den gegebenen Bedingungen maximal erreichbaren 1,3-Propandiol-Konzentrationen sind somit abhängig von der pH-Pufferung des Mediums und den gebildeten Nebenprodukten und nicht von einer Hemmung durch das Endprodukt. Der sich durch den pH-Wert ergebende Effekt auf die Produktbildung erschwert einen Vergleich der Stämme in der Phase der Evaluierung, da er hemmende bzw. fördernde Effekte anderer Medienzusätze überlagert.

Das verwendete Standard-Mineralsalzmedium enthält Phosphatpuffer in einer Konzentration von 66 mmol/L (vgl. Kapitel 3.1.2). Eine Möglichkeit die Produktionsphase zu verlängern, ist die Regulierung des pH-Wertes mittels pH-Korrekturmittel. Im Mikromaßstab ist dies jedoch nur unter großem apparativem Aufwand möglich. Eine einfache Lösung ist es, die pH-Pufferkapazität des Mediums zu erhöhen. Einige pH-Puffersysteme wirken jedoch hemmend auf das Wachstum von Mikroorganismen. Phosphatpuffer bindet zwei- und dreiwertige Metallionen, dieses führt zur Bildung schwerlöslicher Komplexe, so dass sowohl die pH-Pufferkapazität abnimmt, als auch eventuell zum Wachstum nötige Metallionen nicht mehr zur Verfügung stehen.

Im Zusammenhang mit der Produktion organischer Säuren wie Milchsäure (Zhang et al., 2007b) oder Fumarsäure (Roa Engel et al., 2008) wird häufig Calciumcarbonat als Neutralisationsmittel eingesetzt. Da die Bildung von 1,3-Propandiol lediglich der Regeneration der Reduktionsäquivalente dient und keine Energie dabei gewonnen wird, entstehen zwangsweise Nebenprodukte, so dass eine vergleichbare Situation vorliegt.

Calciumcarbonat kann als „Alkali-Reserve“ dem Kultivierungsmedium zugegeben werden. Die Pufferfunktion des Calciumcarbonats basiert auf zwei Reaktionen. Schwerlösliches Carbonat (13 mg/L in Wasser bei 20°C; Herstellerangaben Carl Roth, Deutschland) reagiert mit den bei der Säureproduktion entstehenden freien Hydrogenionen zum löslichen Hydrogencarbonat, welches wiederum im sauren Milieu zu Kohlendioxid und Wasser reagiert. Säuren werden so unter Bildung ihrer Calciumsalze neutralisiert ((Bast, 2001), vgl. Abbildung 4.4).

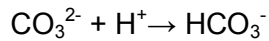


Abbildung 4.4: Reaktionen von Calciumcarbonat im sauren Milieu

Der Einfluss des Zusatzes von Calciumcarbonat auf einen Testorganismus wurde während einer Kultivierung im Schüttelkolben untersucht. Als Testorganismus wurde einer der neu isolierten Stämme, AKR17b, aus dem konventionellen Screening verwendet. Es handelt sich um einen Gram-positiven Sporenbildner, der als Hauptprodukt Essigsäure und n-Buttersäure produziert. Es wurde ein Mineralsalzmedium mit 75 g/L Pharmaglycerin und 10 g/L Calciumcarbonat verwendet. Als Kontrolle wurde Medium ohne Zusatz von Calciumcarbonat getestet.

Da unter Umständen ein Mangel an zugesetzten Nährstoffen ebenso zum vorzeitigen Abbruch der Produktionsphase führen kann, wurde zusätzlich zu dem Medium mit der Standardkonzentration an Hefeextrakt (1 g/L) auch Medien mit der doppelten Menge an Hefeextrakt (2 g/L) getestet. Der Verlauf der Produktbildung und des pH-Wertes sind in Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6 dargestellt.

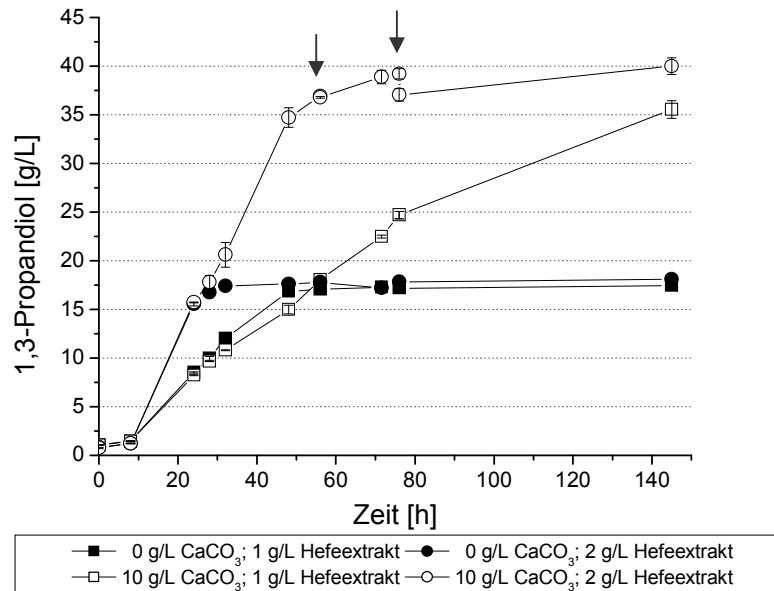


Abbildung 4.5: Verlauf der 1,3-Propanediol-Konzentration bei Einsatz von 0 und 10 g/L CaCO₃ mit 1 bzw. 2 g/L Hefeextrakt - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 75 g/L Pharmaglycerin, anaerob, 32°C, 250 upm, Pfeil markiert Glycerin-Zugabe in Kultivierung mit 10 g/L CaCO₃ und 2 g/L Hefeextrakt (o))

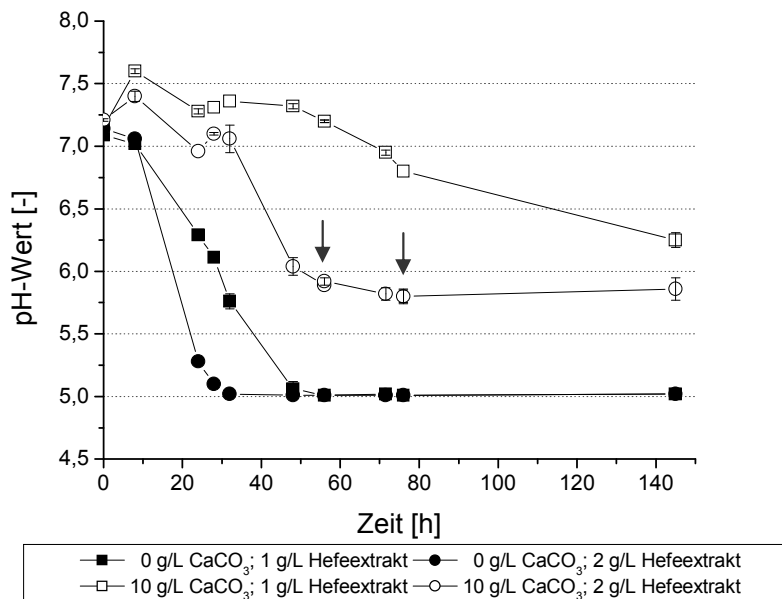


Abbildung 4.6: Verlauf des pH-Wertes bei Einsatz von 0 und 10 g/L CaCO₃ mit 1 bzw. 2 g/L Hefeextrakt - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 75 g/L Pharmaglycerin, anaerob, 32°C, 250 upm, Pfeil markiert Glycerin-Zugabe in Kultivierung mit 10 g/L CaCO₃ und 2 g/L Hefeextrakt (o))

Bei Einsatz der Standardzusammensetzung des Mineralsalzmediums (1 g/L Hefeextrakt) ist der Kurvenverlauf der Produktentwicklung ohne und mit Zusatz von Calciumcarbonat bis 48 h nahezu deckungsgleich. Anschließend ist die Produktionsphase bei regulär pH-gepuffertem Medium jedoch beendet, während die Produktion mit zusätzlicher pH-Pufferung noch mindestens bis 80 h anhält. Eine Aussage über den genauen Zeitpunkt des Produktionsabbruchs ist schwierig, da zwischen 80 und 148 h keine Messpunkte vorliegen. Die erreichte 1,3-Propandiol-Endkonzentration ist mit 35,5 g/L doppelt so hoch wie unter Standardbedingungen, wobei noch eine Konzentration von ca. 8 g/L Restglycerin vorliegt. Bei Betrachtung des pH-Wert-Verlaufes ist zu erkennen, dass der pH-Wert unter Standardbedingungen nach 48 h bereits auf pH 5,1 gefallen ist, während der pH-Wert im Ansatz mit Calciumcarbonat-Pufferung noch bis 72 h bei pH 7 liegt. Der pH-Wert am Ende der Fermentation ist mit 6,3 hoch im Vergleich zu den bei regulär gepufferten pH-Werten.

Bei verdoppelter Hefeextrakt-Konzentration ergibt sich prinzipiell der gleiche Verlauf, allerdings mit erheblich erhöhter Produktivität. Die Produktionsphase im regulär pH-gepufferten Medium ist bei nur geringfügig erhöhter Endkonzentration bereits 16 h früher, nach 32 h, beendet und der pH-Wert ist auf 5 gesunken. Der zusätzlich mit Calciumcarbonat gepufferte Ansatz erreicht nach zunächst parallelem Verlauf nach nur 56 h mit 37 g/L 1,3-Propandiol erneut die doppelte Endkonzentration. Zu diesem Zeitpunkt war das Substrat nahezu verbraucht (2,8 g/L Restglycerin), so dass ca. 12 g/L und nach 76 h erneut 7 g/L steriles Pharmaglycerin zugeführt wurden. So ließ sich die Endkonzentration insgesamt auf 40,4 g/L

1,3-Propandiol steigern. Der pH-Wert dieser Kultivierung fiel bereits nach 32 h unter 7 und sank anschließend auf einen Endwert von 5,8.

Der Einsatz von Calciumcarbonat für eine verbesserte pH-Pufferung war erfolgreich. Lag- und Produktionsphase der Kultivierung verliefen mit und ohne Calciumcarbonat nahezu parallel, so dass eine Hemmung durch die zugesetzte Substanz ausgeschlossen wird. Die Produktionsphase konnte deutlich verlängert werden und der pH-Wert blieb länger im neutralen Bereich. Eine Verdopplung des zugesetzten Hefeextraktes brachte keine signifikante Erhöhung der 1,3-Propandiol-Endkonzentration, führte jedoch zu einer stark erhöhten Produktivität. Da kurze Kultivierungszeiten für eine spätere Übertragung in den Mikromaßstab wichtig sind, um dort auftretende Probleme durch Verdunstung zu minimieren (vgl. Kapitel 4.2.2), ist der Einsatz der erhöhten Hefeextrakt-Konzentration sinnvoll. Die Umsetzung des Glycerins (75 g/L) erfolgte vollständig, so dass es zu einem frühzeitigen Abbruch der Produktionsphase kam. Hinzu kommt dass die pH-Pufferkapazität der eingesetzten Menge an Calciumcarbonat bei einer Kultivierung mit 2 g/L Hefeextrakt bereits nahezu erschöpft war.

Im nächsten Schritt der Optimierung des pH-Puffersystems erfolgte die Variation der eingesetzten Calciumcarbonat-Menge bei erhöhter Glycerin-Konzentration.

Die Optimierung der einzusetzenden Menge an Calciumcarbonat wurde mit Mineralsalzmedium (inklusive 66 mmol/L Phosphat) mit 2 g/L Hefeextrakt und einer Startkonzentration von 100 g/L Pharmaglycerin durchgeführt. Zur Abschätzung der benötigten Menge an Calciumcarbonat wurden typische Säurekonzentrationen, die bei Fermentation von *Clostridium butyricum* entstehen, herangezogen. In einem Batch-Prozess bei vollständigem Umsatz des Glycerins und einer Ausbeute von 0,5 g/g würden 50 g/L 1,3-Propandiol gebildet. Hierbei werden beispielsweise 10 g/L Buttersäure (ca. 120 mmol/L) und 5 g/L Essigsäure (ca. 80 mmol/L) gebildet. 1 Mol Calciumcarbonat kann bei Komplettumsatz 2 Mol Hydrogenionen neutralisieren (vgl. Abbildung 4.4). Geht man von kompletter Dissoziation der Säuren aus, werden zur Neutralisation der oben angegebenen Säuremengen ca. 10 g/L Calciumcarbonat (100 mmol/L) benötigt.

Es wurden 10, 15 und 20 g/L Calciumcarbonat als pH-Puffer-Zusatz getestet. Als Negativkontrolle wurde Medium ohne Zusatz von Calciumcarbonat eingesetzt. Als Modellorganismus wurde das Isolat AKR17b verwendet. Der Verlauf der 1,3-Propandiol-Konzentration ist in Abbildung 4.7, der des pH-Wertes in Abbildung 4.8 dargestellt.

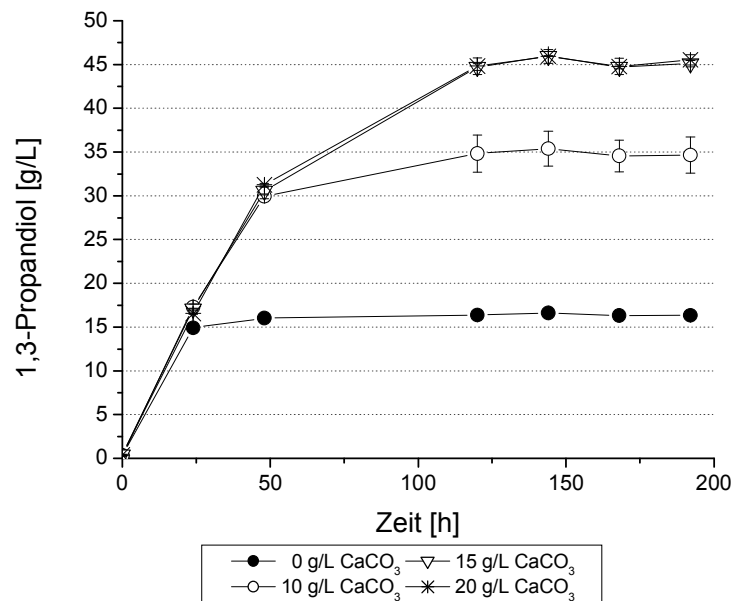


Abbildung 4.7: Verlauf der 1,3-Propandiol-Konzentration bei Einsatz von 0, 10, 15 und 20 g/L CaCO_3 - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 250 upm)

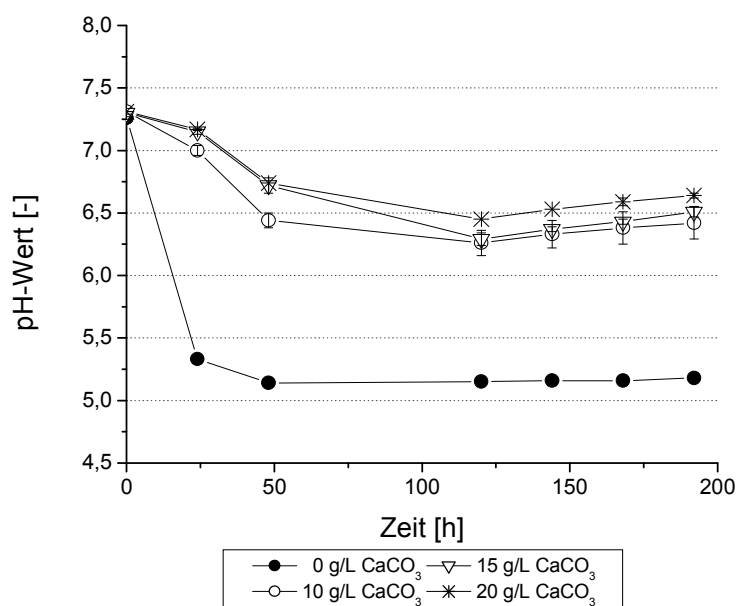


Abbildung 4.8: Verlauf des pH-Wertes bei Einsatz von 0, 10, 15 und 20 g/L CaCO_3 - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 250 upm)

Es ist zu beobachten, dass alle Produktbildungskurven bis zu einer Kultivierungsdauer von 24 h parallel verlaufen. Zu diesem Zeitpunkt ist der pH-Wert des Mediums ohne Calciumcar-

bonat bereits auf 5,3 gefallen. Die Produktionsphase ist nahezu beendet und die Konzentration an 1,3-Propandiol erhöht sich nur noch geringfügig (von 14,9 auf 16,3 g/L).

Die Ansätze, die zusätzlich mit Calciumcarbonat pH-gepuffert wurden, zeigen bis 48 h einen parallelen Produktionsverlauf mit ca. 30 g/L 1,3-Propandiol. Die Endkonzentration Bei Einsatz von 10 g/L Calciumcarbonat als pH-Pufferung ist mit 34,6 g/L 1,3-Propandiol (nach 7 d) deutlich niedriger als die, die bei Einsatz von 15 bzw. 20 g/L erreicht wurden. Diese waren mit 45,1 bzw. 45,5 g/L nahezu gleich. Dies entspricht einer Steigerung von 180 % im Vergleich zu Phosphat-gepuffelter Kultivierung. Die Restkonzentration an Glycerin ist in beiden Fällen ca. 20 g/L, so dass kein Substratmangel vorlag. Der Produktionsprozess war unter den gegebenen Bedingungen nach 5 d abgeschlossen, ein früheres Ende der Produktionsphase ist wahrscheinlich, jedoch liegen in diesem Zeitraum keine Messpunkte vor.

Die pH-Wert-Kurven der Calciumcarbonat-gepufferten Kultivierungen verlaufen nahezu deckungsgleich, nur der pH-Wert der Kultivierung mit 10 g/L liegt geringfügig niedriger. Der pH-Wert sinkt in den ersten 48 h der Kultivierung von 7,3 auf 6,7 (bzw. 6,4). Anschließend variiert der pH-Wert aller Kultivierungen nur noch geringfügig.

Die eingesetzten Calciumcarbonat-Konzentrationen führten zu einer deutlichen Steigerung der 1,3-Propandiol-Endkonzentration. 10 g/L Calciumcarbonat sind jedoch nicht ausreichend, da es hier zu einem frühzeitigen Abbruch der Produktionsphase kam. Bei Einsatz von 15 und 20 g/L Calciumcarbonat wurden parallele Kurvenverläufe beobachtet. Für den hier eingesetzten Testorganismus ist der Einsatz von 15 g/L Calciumcarbonat als pH-Puffersubstanz ausreichend, wobei die höhere Menge an Calciumcarbonat den Prozess nicht merklich hemmt. Da andere Stämme eventuell eine höhere Säureproduktion aufweisen oder stärkere Säuren produzieren (vgl. Tabelle 4.7), muss ausreichend pH-Pufferkapazität gewährleistet sein. Die Calciumcarbonat-Konzentration sollte somit mindestens 20 g/L betragen.

4.2.2 Scale-down für den Einsatz in 96-Deep-Well-Platten

Im Anschluss an das primäre Screening ist die Anzahl der zu untersuchenden Stämme zu meist sehr hoch. Um eine angemessene statistische Sicherheit zu gewährleisten sollten experimentelle Arbeiten mindestens im Doppelansatz durchgeführt werden. Eine detaillierte Evaluierung erfordert somit einen sehr hohen Probendurchsatz. Daher soll der Maßstab der Kultivierungen von 30 mL in Hungate-Röhrchen auf 1 mL in 96-Deep-Well-Platten (DWP) geändert werden, so dass Arbeits-, Platz- und Materialaufwand verringert werden. Die Kultivierung in DWP bietet außerdem die Option zur Automatisierung.

Bei der Kultivierung in DWP stellt die Verdunstung von Medienkomponenten bzw. Fermentationsprodukten während der Inkubation ein großes Problem dar (Duetz und Witholt, 2001). Dies kann eine künstliche Erhöhung bzw. Verringerung der Endkonzentration verursachen. Bei einer verlängerten Produktionsphase durch eine verbesserte pH-Pufferung oder eine

lange Lag-Phase muss die Kultivierungsdauer erheblich verlängert werden, so dass die Verdunstung starke Auswirkungen auf die Produktkonzentration haben kann. Inwiefern diese Verdunstung bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden muss, soll im folgenden Abschnitt geklärt werden.

4.2.2.1 Einfluss der Verdunstung bei Kultivierung in 96-Deep-Well-Platten

Der Einfluss der Verdunstung auf die Substanzen Glycerin, Phosphat, 1,3-Propandiol, n-Buttersäure und Essigsäure in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer wurde untersucht. Hierzu wurden zwei Standardlösungen verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 4.8 gegeben ist. Die gewählten Konzentrationen entsprechen Werten, die in den Evaluierungsversuchen angewendet werden sollen bzw. durch Umsetzung von 100 g/L Glycerin durch *Clostridium butyricum* typischerweise entstehen.

Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Standardlösungen zur Bestimmung der Verdunstung in DWP

Standardlösung	Substanz	Dampfdruck (20°C) [hPa]	Siedepunkt [°C]	Konzentration [g/L]
1	Glycerin	< - 0,001	290	60
	1,3-Propandiol	< - 0,1	213 – 215	60
	Phosphat	-	-	7,5
2	n-Buttersäure	0,56	162 – 165	5
	Essigsäure	15,40	116 - 118	3

Die Standardlösungen wurde in der Reihe 12 (Standard 1) bzw. Reihe 11 (Standard 2) einer DWP inkubiert. Die Wells waren mit einer gasdurchlässigen Viskose-Folie verschlossen. Proben wurden im Doppelansatz genommen (Abbildung 4.9). Die übrigen Wells der DWP enthielten mikrobielle Kultivierungen, die im Rahmen der Optimierung durchgeführt wurden. Die Proben wurden mittels HPLC-Analyse auf ihre Zusammensetzung untersucht.

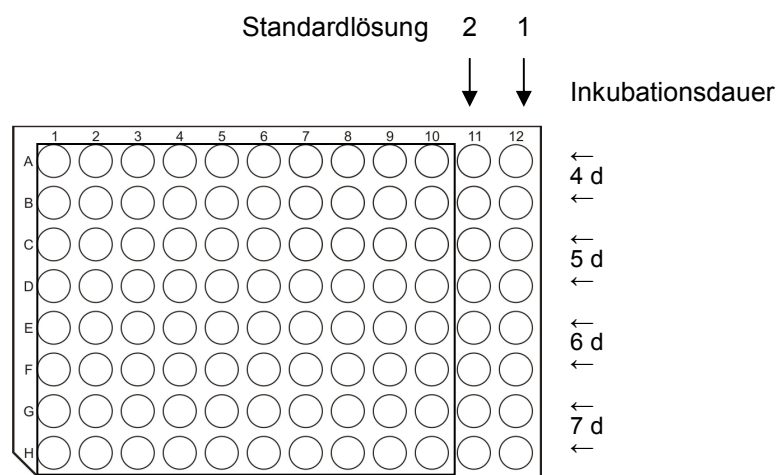


Abbildung 4.9: Evaluierung des Verdunstungseinflusses auf die Standardlösungen 1 und 2 - Lage der untersuchten Wells in der DWP

Die prozentualen Abweichungen der Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Probenahme zu denen zum Startzeitpunkt sind in Abbildung 4.10 für Standardlösung 1 und in Abbildung 4.11 für Standardlösung 2 dargestellt.

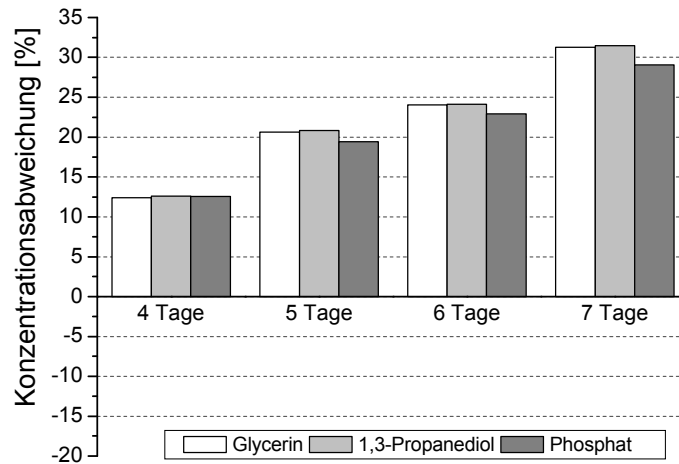


Abbildung 4.10: Einfluss der Verdunstung auf die Konzentrationen der Standardlösung 1 während der Kultivierung in einer DWP (Bedingungen: 1mL Standard pro Well, verschlossen mit gasdurchlässiger Viskosefolie, 350 upm, 32°C im Inkubator der Anaerobierbank) – prozentuale Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

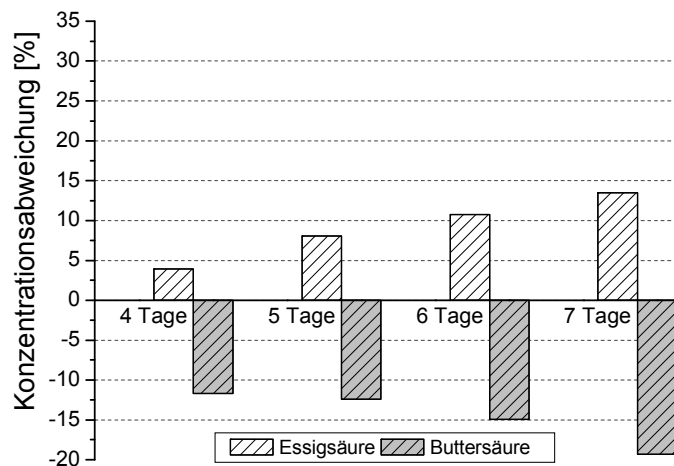


Abbildung 4.11: Einfluss der Verdunstung auf die Konzentrationen der Standardlösung 2 während der Kultivierung in einer DWP (Bedingungen: 1mL Standard pro Well, verschlossen mit gasdurchlässiger Viskosefolie, 350 upm, 32°C im Inkubator der Anaerobierbank) – prozentuale Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Glycerin, 1,3-Propandiol und Phosphat sind schwer- bzw. nichtflüchtige Substanzen (vgl. Tabelle 4.8), so dass die Verdunstung unter gegebenen Bedingungen nicht zu erwarten ist. Durch Verdunstung des Lösungsmittels Wasser kommt es in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu einer Zunahme der Konzentration. Diese ist bei den drei Substanzen nahezu gleich, nach 4 d sind die Konzentrationen bereits um ca. 12,5 % erhöht, nach 7 d um ca.

30 %. Dies entspricht einer Abnahme des Volumens im Well (1000 µL Arbeitsvolumen) von ca. 240 µL auf 760 µL in 7 d. Für die Auswertung des Substrates und des Produktes muss die Verdunstung berücksichtigt bzw. korrigiert werden, da diese in der Regel zu hoch gemessen werden.

Die Substanzen in Standardlösung 2, n-Buttersäure und Essigsäure, haben relativ niedrige Siedepunkte im Vergleich der Substanzen in Standard 1 (vgl. Tabelle 4.8). Hier kam es neben der Verdunstung des Lösungsmittels auch zu Abweichungen bei den untersuchten Substanzen selbst, welche wahrscheinlich auf Verdunstungseffekte zurückzuführen sind. Im Falle von Essigsäure kam es zu einer erheblich verringerten Konzentrationszunahme (4 % nach 4 d bzw. 13,5 % nach 7 d). Bei n-Buttersäure zeigte sich sogar eine Konzentrationsabnahme in Abhängigkeit der Inkubationsdauer, nach 4 d wurden ca. 12 % und nach 7 d 19 % weniger als zu Beginn der Inkubation gemessen. Die Auswertung flüchtiger Medienkomponenten ist somit nach Inkubation in der DWP insgesamt nicht bedenkenlos möglich.

Die Konzentrationsschwankungen aller betrachteten Substanzen sind durch Verdunstungseffekte nach 4 d bereits erheblich. Der Grad der Konzentrationsabweichungen wird von unterschiedlichen Faktoren abhängen, wie z. B. die Güte der Abdichtung der DWP, die Anzahl der gleichzeitig inkubierten DWP, der Luftfeuchtigkeit im Inkubator, der Inkubationsdauer und –temperatur. Er ist somit nicht reproduzierbar konstant und muss standardmäßig für jede Kultivierung in DWP ermittelt werden.

Die Stärke der Verdunstung wurde bei allen weiteren Untersuchungen mittels Glycerin-Standard (10 g/L) berechnet. Da die Stärke der Verdunstung in Mikrotiterplatten von der Position des Wells abhängig ist (Duetz, 2007) wurden in jeder inkubierten DWP die Reihen 6 und 12 mit dem Standard belegt, um einen repräsentativen Mittelwert der Glycerinkonzentrationen nach der Inkubation zu erhalten. Die durchschnittliche Verdunstung wurde gemäß Gleichung 4.2 berechnet.

$$\text{Verdunstung}[\%] = \left(\frac{\text{Endwert}[\text{g/L}] \times 100\%}{\text{Anfangswert}[\text{g/L}]} \right) - 100\% \quad \text{Gleichung 4.2}$$

Die Verdunstung wurde nach Gleichung 4.3 zur Korrektur aller Konzentrationen verwendet, die im zellfreien Überstand der inokulierten Wells bestimmt wurden.

$$\text{Wert}_{\text{korrigiert}}[\text{g/L}] = \frac{\text{Wert}_{\text{gemessen}}[\text{g/L}] \times 100\%}{(\text{Verdunstung}[\%] + 100\%)} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

Zur Minimierung der Verdunstung wurden DWP zusätzlich zu der gasdurchlässigen Viskosefolie mit dem Polystyroldeckel einer Mikrotiterplatte verschlossen und der Deckel mit Parafilm abgedichtet (vgl. Abbildung 3.5).

4.2.2.2 Übertragung der optimierten Kultivierungsparameter in den Mikromaßstab

Es wurde ein Testorganismus der Spezies *Clostridium butyricum* ausgewählt, da das Screening zunächst auf die Isolierung von 1,3-Propandiol-Bildnern der Gattung *Clostridium* ausgelegt sein sollte. Für den Fall, dass die isolierten Stämme späterer Screening-Verfahren anderen Gattungen angehören, müssen die Bedingungen eventuell adaptiert werden. Als Testorganismus für die Übertragung in den DWP-Maßstab wurde der gut charakterisierte Stamm *Clostridium butyricum* NRRL 1024 verwendet. Dieser gute 1,3-Propandiol-Produzent wurde verwendet, um zu beurteilen, ob ein Abbruch der Produktionsphase durch die Kultivierungsbedingungen oder die Stammeigenschaften verursacht wird.

Im Schüttelkolben wurde für die pH-Pufferung mit Calciumcarbonat eine Konzentration von 20 g/L Calciumcarbonat für die Umsetzung von 100 g/L Pharmaglycerin ermittelt. Eine Verdoppelung des Hefeextraktes auf 2 g/L konnte den Prozess erheblich beschleunigen, die Umsetzung war unter diesen Bedingungen nach spätestens 5 d abgeschlossen (vgl. Kapitel 4.2.1). Diese Ergebnisse sollen nun in der DWP angewendet werden.

Getestet wurden neben 20 g/L Calciumcarbonat auch Konzentrationen von 25 und 30 g/L für den Umsatz einer Pharmaglycerin-Startkonzentration von 100 g/L, da es sich beim Testorganismus um einen nachgewiesenen guten 1,3-Propandiol-Produzenten handelt. Der Stamm *Clostridium butyricum* NRRL 1024 erreichte unter Standardbedingungen bei Fed-Batch Kultivierung über 50 g/L 1,3-Propandiol (Bock, 2004). Bei einer Ausbeute von 0,5 g/g wäre diese Endkonzentration in der hier durchgeführten Batch-Kultivierung ebenfalls möglich.

Analog zu Kapitel 4.2.2.1 wurden die DWP nur mit einer gasdurchlässigen Folie verschlossen. Proben wurden im Doppelansatz nach 4, 5 und 6 d genommen. Die korrigierte 1,3-Propandiol-Konzentration ist in Abbildung 4.12 dargestellt.

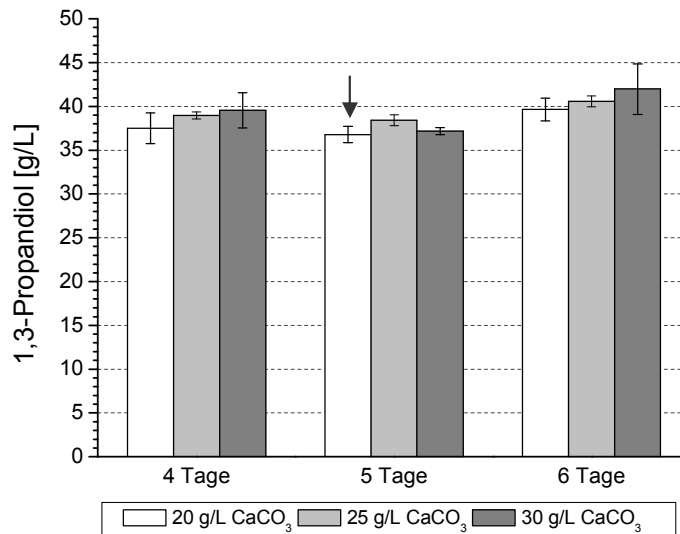


Abbildung 4.12: 1,3-Propanediol-Konzentration bei Einsatz von 20, 25 und 30 g/L CaCO₃, bestimmt nach 4, 5 und 6 d Inkubation und korrigiert nach Gleichung 4.2 und Gleichung 4.3 - Kultivierung von *C. b. NRRL 1024* (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 350 upm); Pfeil markiert optimale Bedingungen im Schüttelkolben

Bei den im Schüttelkolben mit AKR17b optimierten Bedingungen, 20 g/L Calciumcarbonat und 5 d Inkubation (Pfeilmarkierung), wurden ca. 37 g/L 1,3-Propanediol erreicht. Dies ist deutlich niedriger als die 50 g/L 1,3-Propanediol, die im Fed-Batch erreicht wurden (Bock, 2004). Eine Erhöhung der Calciumcarbonat-Konzentration erbrachte hier keine deutliche Steigerung der Endkonzentration (36,8 - 38,4 g/L). Nach 4 d ist ein geringer Einfluss der eingesetzten Calciumcarbonat-Konzentration in Form einer stufenweisen Erhöhung der Endkonzentration von 37,5 auf 39,6 g/L, allerdings bei großem statistischem Fehler, zu beobachten.

Werden die unterschiedlichen Zeitpunkte betrachtet, so ist zu erkennen, dass die Reaktion bereits nach 4 d abgeschlossen zu sein scheint: Es findet keine Steigerung der Endkonzentration von 4 auf 5 d statt. Eine verlängerte Inkubationsdauer von 6 d ergibt zwar, besonders bei der höchsten Calciumcarbonat-Zugabe, höhere Endkonzentrationen (39,7 - 42,0 g/L), allerdings sind hier die statistischen Abweichungen bereits erheblich.

Zur genauen Beurteilung werden die pH-Werte der Kultivierungen in Abbildung 4.13 betrachtet.

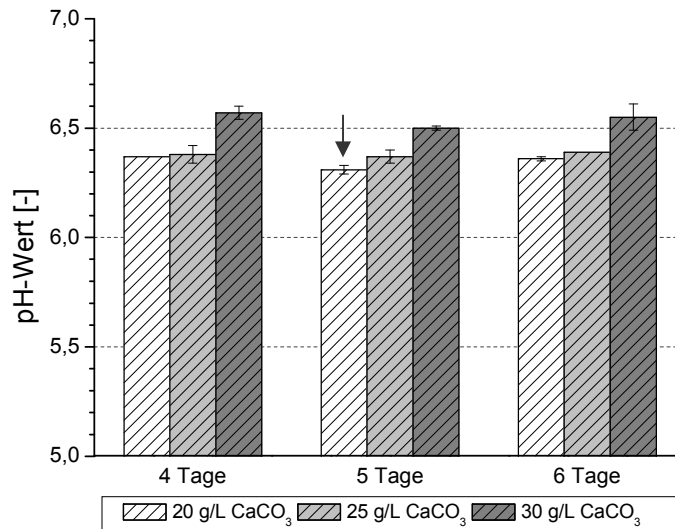


Abbildung 4.13: pH-Wert bei Einsatz von 20, 25 und 30 g/L CaCO₃, bestimmt nach 4, 5 und 6 d Inkubation und korrigiert nach Gleichung 4.2 und Gleichung 4.3 - Kultivierung von *C. b. NRRL 1024* (DWP, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 350 upm); Pfeil markiert optimale Bedingungen im Schüttelkolben

Die pH-Werte liegen unabhängig von der Inkubationsdauer nahezu konstant zwischen 6,4 und 6,5. Da die 1,3-Propandiol-Produktion dieses Stammes mit der Bildung von n-Butter- und Essigsäure einhergeht, bestätigt dies, dass die Produktionsphase unter den gegebenen Bedingungen bereits nach 4 d beendet war. Insgesamt ist der pH-Wert bei Erhöhung der Calciumcarbonat-Konzentration nur geringfügig höher.

Der Einsatz von Calciumcarbonat als pH-Puffersubstanz konnte in den DWP-Maßstab übertragen werden. Die zuvor festgelegten Parameter, 20 g/L Calciumcarbonat eine Inkubationsdauer von 5 d erwiesen sich auch in der DWP als sinnvoll.

Die unter den gewählten Bedingungen maximal erreichbaren Endkonzentrationen waren noch deutlich unterhalb der im Fed-Batch erreichten Konzentration. Dies könnte u. a. darauf zurückgeführt werden, dass der pH-Wert trotz verbesserter pH-Pufferung noch immer auf suboptimale Werte (6,4 - 6,5) abgesunken ist. In diesem pH-Bereich sind die hemmenden Effekte der vorliegenden organischen Säuren deutlich stärker als bei neutralem pH-Wert (vgl. Kapitel 2.1.3). Die Durchmischung in den Wells in DWP ist wesentlich geringer als im Schüttelkolben (Duetz, 2007), so dass es zu Inhomogenitäten des pH-Wertes an der Grenzfläche zum festen pH-Pufferreservoir kommen kann. Das eingesetzte Calciumcarbonat oder die in Folge der Fermentation entstehenden Calciumsalze können ebenfalls einen hemmenden Effekt haben.

Eine Erhöhung der Calciumcarbonat-Konzentration erbrachte keine wesentliche Steigerung der Endkonzentration, so dass 20 g/L Calciumcarbonat für Versuche zur Evaluierung der

Produktionsstämme mit den Eigenschaften der Gattung *Clostridium* (Gram-positiv, Bildung von Endosporen, strikt anaerob) eingesetzt werden.

Zwar erwies sich eine Inkubationsdauer von 4 d unter den gegebenen Bedingungen als ausreichend, jedoch werden in den Evaluierungsversuchen auch suboptimale Bedingungen, z. B. durch verringertes Nährstoffangebot oder den Einsatz verunreinigter Glycerine, eingesetzt. Zudem sollen ebenfalls unbekannte Stämme mit eventuell langsamerem Wachstum bzw. Produktion getestet werden. Aus diesem Grund wird für die Evaluierung die Inkubationsdauer von 5 d beibehalten.

4.2.3 Zusammenfassung – Optimierung der Evaluierungsphase

Ziel der Optimierung war einerseits eine Verlängerung der Produktionsphase zur besseren Beurteilung und einem aussagekräftigen Vergleich der Isolate. Andererseits sollte der Kultivierungsmaßstab verkleinert, der Durchsatz erhöht und so eine ausführliche, statistisch abgesicherte Evaluierung ermöglicht werden.

Die Bestimmung der optimalen Bedingungen erfolgte zunächst im Schüttelkolben. Durch den Einsatz von Calciumcarbonat als pH-Puffersubstanz konnte die Produktionsphase des Stammes AKR17b deutlich verlängert werden. Die Endkonzentration an 1,3-Propandiol konnte durch den Einsatz von Calciumcarbonat gegenüber den Standardbedingungen verdreifacht werden. Eine Hemmung durch Calciumcarbonat in Form einer verlängerten Lag-Phase oder verringerter Produktivität lag nicht vor.

Durch die Verdopplung der eingesetzten Menge an Hefeextrakt wurde die erreichbare Endkonzentration nicht erhöht, die Produktivität stieg jedoch erheblich. Um die Dauer der Inkubation zu minimieren, wurde in Evaluierungen mit mehr als 100 g/L Pharmaglycerin die erhöhte Menge an Hefeextrakt eingesetzt. Bei Hemmung durch hohe Substratkonzentrationen oder Verunreinigungen aus Rohglycerin ist mit stark verlängerter Lag-Phase und verringerter Produktivität zu rechnen (Colin et al., 2000; Hirschmann et al., 2005).

Durch die Optimierung der Evaluierung im Schüttelkolben ergaben sich folgende Bedingungen für die Umsetzung von 100 g/L Pharmaglycerin: 20 g/L Calciumcarbonat, 2 g/L Hefeextrakt, 5 d Inkubation.

Im Rahmen der Vorarbeiten zur Kultivierung in DWP galt es zunächst den Einfluss der Verdunstung, die während der Kultivierung in DWP auftritt, auf die Edukt- bzw. Produktkonzentrationen zu untersuchen. Die Konzentrationen der schwerflüchtigen Substanzen Glycerin und 1,3-Propandiol wurden durch die Verdunstung des Lösungsmittels deutlich erhöht. Zur Minimierung der Verdunstung wurde die Abdichtung der DWP verbessert. Der Grad der Verdunstung wurde zusätzlich in allen Kultivierungen durch den Einsatz eines Glycerin-Standards ermittelt und die gemessenen Konzentrationen rechnerisch korrigiert.

Die flüchtigen organischen Säuren Essig- und n-Buttersäure verdunsteten, ebenso wie das Lösungsmittel, während der Kultivierung, so dass die rechnerische Korrektur zu verfälschten Ergebnissen führt. Die Nebenprodukte können bei Inkubation in DWP somit nur qualitativ beurteilt werden.

Die Kultivierungsbedingungen der Optimierung im Schüttelkolben konnten in den Mikromaßstab übertragen werden. Die maximal durch *C. butyricum* NRRL 1024 erreichbaren Endkonzentrationen lagen jedoch noch deutlich unterhalb der für diesen Stamm im Fed-Batch erreichten Endkonzentrationen. Dies ist auf suboptimale pH-Bedingungen, Stoffgradienten und Hemmeffekte durch Fermentationsprodukte zurückzuführen. Eine erhebliche Steigerung der erreichbaren Produktkonzentrationen ermöglicht jedoch eine Differenzierung der Ergebnisse einer Evaluierung und damit eine fundierte Einschätzung der Produktionsstämme.

4.3 Variation der Anreicherungsstrategie

Die konventionelle Anreicherung sollte in mehreren Schritten hinsichtlich der Selektivität und des Probedurchsatzes optimiert werden. Hierfür wurden die folgenden wesentlichen Anforderungen an einen Hochleistungsproduktionsstamm definiert:

Tabelle 4.9: Definition der gewünschten Stammeigenschaften für einen 1,3-Propandiol-Hochleistungsproduzenten und deren Auswirkungen

Anforderung an Produktionsstamm	Auswirkung auf den Fermentationsprozess
Risikogruppe 1 / nicht pathogen	minimale Sicherheitsmaßnahmen im Groß-Maßstab
Hohe 1,3-Propandiol-Toleranz	Hohe 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen möglich
Verwertung von Rohglycerin / Hohe Rohglycerin-Toleranz	Verringerung der Fermentations-Rohstoffkosten
Hohe Edukt-Toleranz	(repeated) Batch-Prozess mit hoher Endkonzentration
Nebenprodukt-Toleranz	Verzögerter Abbruch der Produktionsphase
Hohe Ausbeute und Produktivität	Erhöhte Wirtschaftlichkeit des Fermentationsprozesses
Geringer Bedarf an Supplinen	Verringerung der Fermentations-Rohstoffkosten
Einfache Handhabung / Sauerstoff-Toleranz / Langzeitstabilität	Hohe Reproduzierbarkeit

Um gezielt hinsichtlich der Anforderungen an Produktionsstämme zu selektieren, wurden die Vorbehandlung der Umweltproben, die Zusammensetzung des Anreicherungsmediums und der Maßstab der Anreichungskultur variiert.

In drei aufeinander folgenden Screening Durchgängen wurden unterschiedliche Abschnitte der Anreicherungsphase variiert, um eine Aussage über das optimale Vorgehen zu ermöglichen.

4.3.1 Screening 2 – Optimierung des Anreicherungsmediums

Im Screening-Durchgang 2 sollten mehrere Anforderungen an Produktionsstämme (vgl. Tabelle 4.9) umgesetzt werden. Dies waren der Ausschluss pathogener *Enterobacteriaceae*, hohe 1,3-Propandiol-Toleranz und z. T. Nebenprodukt-Toleranz, die Verwertung von Rohglycerin bzw. eine hohe Rohglycerin-Toleranz und hohe Edukt-Toleranz. Die Anforderungen sollten einerseits durch eine Probenvorbehandlung und andererseits durch die Variation des Anreicherungsmediums erreicht werden. Maßstab und Kultivierungsbedingungen der Anreicherung entsprachen dem konventionellen Screening. Die Anreicherungsbedingungen sind in Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tabelle 4.10: Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 2

Parameter	Anreicherungsbedingungen
Anreicherungsmaßstab	50 mL Hungate-Röhrchen, 30 mL Arbeitsvolumen (Kapitel 3.2.2)
Temperatur	32°C
Durchmischung	unbewegte Suspensionskultur
Sauerstoffbedingungen	anaerob (Stickstoffatmosphäre)
Inokulum	Umweltprobe
Probenmaterial	3 Erdproben aus einer Palmölraffinerie (Tabelle 4.11)
Vorbehandlung	Pasteurisieren (30 min; 60 °C)
Probenkonzentration	33,3 g/L
Anreicherungsmedium	Mineralsalzmedium (Kapitel 3.1.2)
Hefeextrakt	Standardkonzentration (1 g/L)
Glycerinqualität	Rohglycerin (Charge 2; Kapitel 3.1.4)
Haupt-/ Nebenprodukt-Zusatz	1,3-Propandiol, n-Buttersäure, Essigsäure

Abweichend von der konventionellen Anreicherung wurde im zweiten Screening-Verfahren eine Probenvorbehandlung durchgeführt. Unmittelbar nach der Inokulation der Anreicherungskulturen wurden diese pasteurisiert. Hierdurch sollte das Wachstum von Endosporenbildenden Mikroorganismen, hauptsächlich Clostridien, gefördert und die Anreicherung von *Enterobacteriaceae* reduziert werden.

Im konventionellen Screening erwies sich eine Umweltprobe mit natürlicher Vorselektion am Standort als Vorteil. Die in diesem Screening-Verfahren verwendeten Erdproben wurden daher in der unmittelbaren Umgebung einer Palmöl-Raffinerie (Kuala Tanjung, Indonesien) an Standorten gesammelt, an denen der Boden über einen längeren Zeitraum mit Palmöl-Prozesswasser verunreinigt wurde. In diesen Proben ist eine natürliche Anreicherung von Mikroorganismen, die Glycerin verwerten und eine Toleranz gegenüber Fettsäuren aufweisen, wahrscheinlich. Die Probenherkunft ist Tabelle 4.11 zu entnehmen.

Tabelle 4.11: Umweltproben als Inokulum für die Anreicherungskulturen des 2. Screening-Durchgangs

Nr.	Ort der Probenahme	Tiefe [cm]	Umgebungsbedingungen
1	Dekanter-Ablauf, Überlauf, Bodenproben	ca. 10	sonnig, feucht
2	Abwasserbecken, Drainagekanal (Überlauf), Bodenprobe	ca. 15	sonnig, feucht
3	Rekultivierter, behandelter Boden aus Abwasserbecken Schlamm aus Becken wurde untergemengt und bepflanzt	ca. 10	sonnig, feucht bis trocken

Die im konventionellen Screening-Verfahren verwendeten Anreicherungsmedien waren selektiv für anaerobe Glycerin-verwertende Mikroorganismen. Andere Anforderungen an einen Produktionsstamm, wie z. B. hohe Edukt- oder Produkt-Toleranz blieben unberücksichtigt. Neben 1,3-Propandiol-bildenden Mikroorganismen wurden andere Glycerin-Verwerter angereichert, wodurch der Aufwand der Aufreinigung erhöht wurde. Daher wurde im zweiten Screening-Durchgang das Anreicherungsmedium selbst variiert. Es wurden diverse Medien und Medienkombinationen eingesetzt, um im Anschluss an die Anreicherung eine Aussage über das erfolgversprechendste Vorgehen treffen zu können. Die Zusammensetzung der verwendeten Anreicherungsmedien ist in Tabelle 4.12 zusammengefasst.

Tabelle 4.12: Anreicherungsmedien des zweiten Screening-Durchgangs – Standard Mineralsalzmedium mit Zusatz von Edukt und Produkten

Anreicherungsmedium	Medienbestandteile	Zusammensetzung der Konzentrationsstufen [g/L]			Stammanforderung / Selektivität
		niedrig	mittel	hoch	
A	Rohglycerin	50	100	150	Rohglycerin-Verwertung Rohglycerin-Toleranz Edukt-Toleranz
B	Rohglycerin	15	15	15	Rohglycerin-Verwertung
	1,3-Propandiol	40	70	100	1,3-Propandiol-Toleranz
C	Rohglycerin	15	15	15	Rohglycerin-Verwertung
	1,3-Propandiol	40	70	100	1,3-Propandiol-Toleranz
	n-Buttersäure	7,5	15	22,5	Nebenprodukt-Toleranz
	Essigsäure	2,5	5	7,5	

Die Anreicherungsmedien wurden jeweils in drei sukzessiv steigenden Konzentrationsstufen eingesetzt. So sollte ermittelt werden, welche Konzentrationen von den in der Umweltprobe vorliegenden Mikroorganismen gerade noch toleriert werden konnten. Es sollte ermittelt werden in welcher Stufe eine möglichst hohe Selektivität des Mediums bei gleichzeitig aktiven Anreicherungskulturen für die weiteren Screening-Verfahren gewährleistet ist. Als Substrat wurde ausschließlich Rohglycerin (Charge 2, vgl. Tabelle 3.4) verwendet. Da das Screening-Verfahren zur Anreicherung von Clostridien dienen sollte, wurden als Nebenprodukte n-Buttersäure und Essigsäure verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen ungefähr denen, die bei der Produktion der im Medium vorhandenen 1,3-Propandiol-Mengen

durch *Clostridium butyricum* entstanden wären. Die Anreicherung erfolgte in zwei Phasen. Die genaue Vorgehensweise ist Abbildung 4.14 und Abbildung 4.15 zu entnehmen.

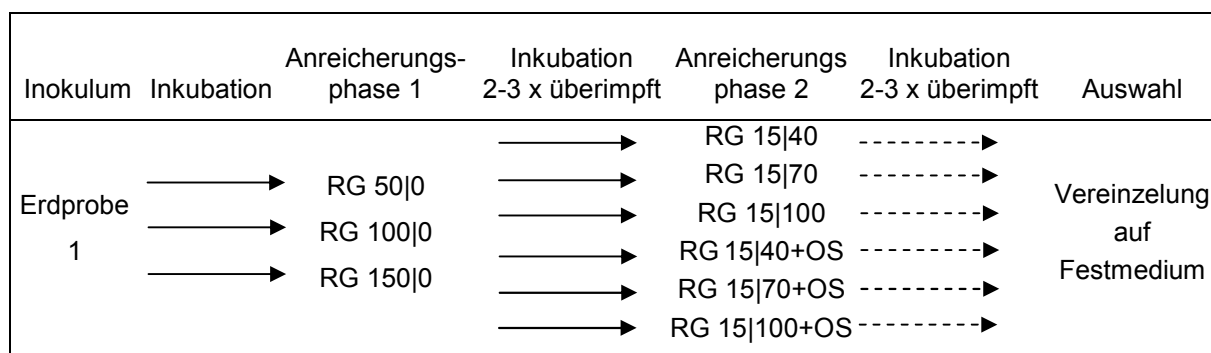


Abbildung 4.14: Schematischer Verlauf des 2. Screening-Durchgangs – Erdprobe 1

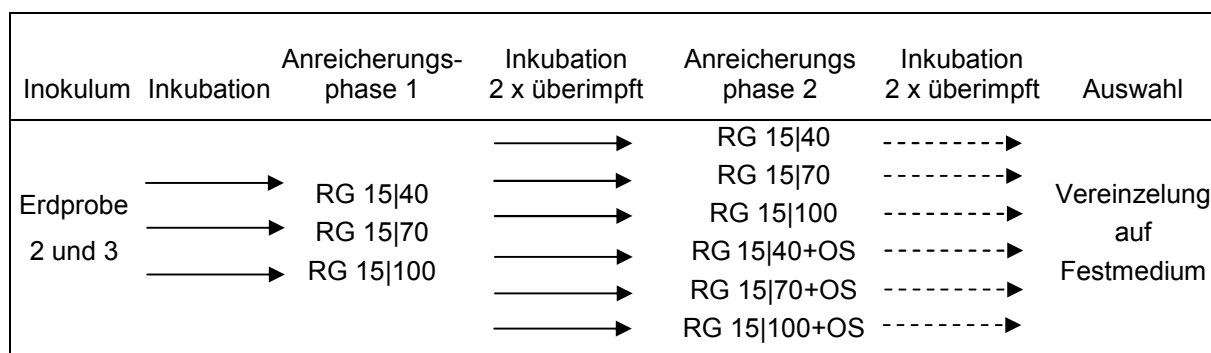


Abbildung 4.15: Schematischer Verlauf des 2. Screening-Durchgangs – Erdprobe 2 und 3

In der ersten Anreicherungsphase wurde einerseits auf hohe Edukt- bzw. Rohglycerin-Toleranz (Anreicherungsmedium A, Abbildung 4.14), andererseits auf 1,3-Propandiol-Toleranz (Anreicherungsmedium B, Abbildung 4.15) selektiert. Um die Anzahl der Anreicherungskulturen zu begrenzen und die Redundanz zu verringern, wurde eine von den insgesamt drei Erdproben ausschließlich im Anreicherungsmedium A, und zwei weitere in Anreicherungsmedium B eingesetzt. Das Hauptprodukt 1,3-Propandiol wurde bereits in der ersten Anreicherungsphase angewendet, da Berichte über den Abbau selten sind und dieser nur unter sehr speziellen Bedingungen abläuft (Oppenberg und Schink, 1990).

Auf Grund der großen Anzahl an Medienvarianten bei begrenzter Inkubationskapazität wurde jedes Medium im Einfachansatz inokuliert. Kulturen, die nach 4 bis 7 d Wachstum sowie metabolische Aktivität zeigten (Trübung und pH-Wert-Absenkung > 0,5) wurden zwei- bis dreimal auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung übertragen. Acht Anreicherungskulturen der ersten Phase zeigten Wachstum und wurden für die zweite Phase der Anreicherungsphase verwendet.

In der zweiten Phase der Anreicherung wurde hinsichtlich des Haupt- und der typischen Nebenprodukte selektiert, wozu zusätzlich Anreicherungsmedium C verwendet wurde.

Ziel dieses zweistufigen Vorgehens war es, in der ersten Phase der Anreicherung zunächst eine hohe Konzentration an Glycerin-Verwertern zu erreichen. Bei Inokulation des Anreicherungsmediums C in der zweiten Phase haben Glycerin-Verwerter somit einen Wachstumsvorteil gegenüber solchen Mikroorganismen, die n-Buttersäure oder Essigsäure als Substrat verwerten. Die Ergebnisse der Anreicherungskulturen der zweiten Phase sind in Tabelle 4.13 dargestellt.

Tabelle 4.13: Übersicht über Kultivierungshergang Ergebnisse der Kulturen der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung im Hungate-Röhrchen (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt); grau hinterlegt: ausgewählte Kulturen zur Aufreinigung

Nr.	Umweltprobe	Anreicherungsmedium 1	Anreicherungsmedium 2	pH-Wert	Glycerin-Verbrauch [g/L]	1,3-PD-Bildung [g/L]	Ausbeute [g/g]
2-1	1	RG 100 0	RG 15 40	6,03	14,7	6,1	0,41
2-2		RG 100 0	RG 15 40+OS	6,35	13,7	8,9	0,64
2-3	2	RG 15 40	RG 15 40	5,58	14,8	3,5	0,24
2-4		RG 15 40	RG 15 70	5,35	10,1	3,8	0,38
2-5		RG 15 40	RG 15 40+OS	6,16	11,6	3,3	0,29
2-6		RG 15 40	RG 15 100	6,12	11,5	0,9	0,08
2-7		RG 15 70	RG 15 40	5,67	14,8	5,4	0,36
2-8		RG 15 70	RG 15 40+OS	6,20	13,7	10,5	0,77
2-9		RG 15 100	RG 15 40	5,97	13,0	5,0	0,39
2-10		RG 15 100	RG 15 40+OS	6,16	7,1	2,6	0,36
2-11		RG 15 100	RG 15 70+OS	6,68	5,3	2,0	0,38
2-12		RG 15 70	RG 15 40	5,78	9,5	2,3	0,24
2-13	3	RG 15 70	RG 15 40+OS	5,86	11,7	5,0	0,42
2-14		RG 15 70	RG 15 70+OS	6,50	4,7	0,7	0,15
2-15		RG 15 100	RG 15 40	5,86	8,4	3,8	0,46
2-16		RG 15 100	RG 15 70	5,62	8,6	0,7	0,09
2-17		RG 15 100	RG 15 40+OS	5,75	11,0	5,2	0,47

Aus allen verwendeten Umweltproben konnten 1,3-Propandiol-Produzenten angereichert werden. Mehr als 50 % der positiven Kulturen waren mit der Umweltprobe 2 beimpft. Insgesamt bildeten 17 Anreicherungskulturen 1,3-Propandiol im Bereich von 0,7 bis 10,5 g/L.

Zwölf dieser Kulturen (70 %) enthielten Medium der geringsten Konzentrationsstufe (vgl. Tabelle 4.12), die 1,3-Propandiol-Konzentrationen lagen zwischen 2,3 und 10,5 g/L. Vier der Kulturen (24 %) wuchsen in Medium der zweiten Konzentrationsstufe mit 1,3-Propandiol-Konzentrationen zwischen 0,7 und 3,8 g/L. Nur eine der Kulturen beinhaltete Medium der höchsten Konzentrationsstufe und bildete aber lediglich 0,9 g/L 1,3-Propandiol. Somit kann die Selektivität des Screenings über die Zugabe der Produkte gut eingestellt werden. Für sehr selektive Bedingungen sind 1,3-Propandiol-Konzentrationen von 70 g/L oder höher ge-

eignet. Die Anwesenheit der organischen Säuren zeigte keinen signifikanten Einfluss, acht der positiven Anreicherungskulturen enthielten organische Säuren, neun nicht.

Die Ausbeute der Anreicherungskulturen schwankt stark im Bereich von 0,08 und 0,77 g/g. Dies ist mit der Nutzung des Substrates und evtl. des 1,3-Propandiols oder der organischen Säuren durch Begleitorganismen zu erklären.

Es wurden bevorzugt Anreicherungskulturen für die Vereinzelung ausgewählt, die Wachstum und 1,3-Propandiol-Bildung bei Anwesenheit hoher Haupt- und Nebenproduktkonzentrationen zeigten. Die Menge des gebildeten 1,3-Propandiol und die Ausbeute wurden ebenfalls berücksichtigt. Neun Kulturen wurden ausgewählt für eine weitere Aufreinigung, diese sind in Tabelle 4.13 grau markiert.

4.3.2 Screening 3a – Anreicherung im Mikromaßstab

Im dritten Screening-Durchgang sollte ein Scale-down in der Anreicherungsphase eingeführt werden. Die Anreicherung in bisherigen Verfahren erfolgte im Hungate-Röhrchen unter anaeroben Bedingungen. Hier sind die Kultivierungskapazitäten begrenzt und die Probenahme umständlich (vgl. Kapitel 3.2.2). So ist die Anzahl der gleichzeitig zu bewältigenden Umweltproben gering. Die Wahrscheinlichkeit einen sehr guten Produktionsstamm zu isolieren, ist jedoch neben der Zusammensetzung der verwendeten Umweltproben auch von deren Anzahl abhängig. Um den Probendurchsatz erheblich zu erhöhen, wird der Maßstab der Kultivierung verkleinert. Es wurden DWP mit quadratischer Well-Form und einem Arbeitsvolumen von 2 mL als Anreicherungsgefäß eingesetzt (vgl. Abbildung 4.16). Diese haben gegenüber Hungate-Röhrchen den Vorteil eines erheblich verringerten Platzbedarfes. Außerdem ist durch standardisierte Größenabmessungen die einfache Beprobung mittels Mehrkanal-Pipetten oder der Einsatz in einem Roboter-System möglich.

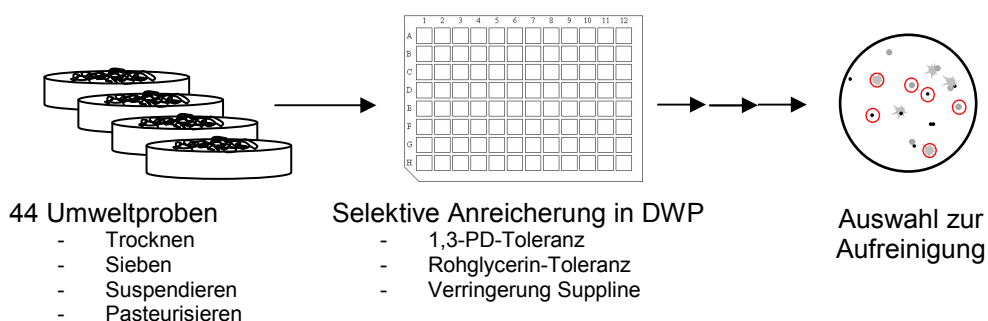


Abbildung 4.16: Scale-down in der Anreicherungsphase - Screening-Durchgang 3

Auf Grund der großen Anzahl an Kulturen müssen die Anreicherungsbedingungen sehr selektiv sein. Eine geringe Selektivität würde nicht nur die Anreicherung wenig leistungsstarker Stämme erlauben, sie würde auch dazu führen, dass eine große Anzahl an Anreicherungs-

kulturen positiv getestet wird. Dies würde den Aufwand der Kolonie-Evaluierung bzw. Aufreinigung erheblich erhöhen. Die Anreicherungsbedingungen sind in Tabelle 4.14 dargestellt.

Tabelle 4.14: Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 3a

Parameter	Anreicherungsbedingungen
Anreicherungsmaßstab	2,2 mL DWP, 2 mL Arbeitsvolumen (Kapitel 3.2.4.2)
Temperatur	32°C
Durchmischung	unbewegte Suspensionskultur
Sauerstoffbedingungen	anaerob (Kultivierung in Anaerobierbank, Stickstoffatmosphäre)
Inokulum	Umweltproben
Probenmaterial	44 Proben, Erd- / Kompost Proben; Deutschland und Indonesien
Vorbehandlung	Trocknung (7 d, 40°C) Siebung (Porengröße: 0,75 - 1,5 mm) Pasteurisieren (30 min; 60 °C)
Probenkonzentration	50 g/L
Anreicherungsmedium	Mineralsalzmedium (Kapitel 3.1.2)
Hefeextrakt oder Vitaminlösung DSMZ 141	1/20 der Standardkonzentration Ersatz für Hefeextrakt
pH-Indikator	Phenolrot bzw. Bromthymolblau
Glycerinqualität	Rohglycerin (Charge 2; Kapitel 3.1.4)
Produkt-Zusatz	1,3-Propandiol

Das Anreicherungsmedium wurde in diesem Durchgang ebenfalls weiterentwickelt. Die Anforderungen an Produktionsstämme waren, wie auch im Screening 2, 1,3-Propandiol-Toleranz und Rohglycerin-Verwertung. Dort wurden Anreicherungsmedien mit stark variierender Zusammensetzung eingesetzt (vgl. Tabelle 4.12) und es zeigte sich in der Anreicherungsphase, dass die Vorlage von 70 g/L 1,3-Propandiol eine hohe Selektivität des Anreicherungsmediums bei Wachstum in wenigen Kulturen ermöglichte.

Die Zusammensetzung der Anreicherungsmedien ist in Tabelle 4.15 zusammengefasst.

Tabelle 4.15: Anreicherungsmedien des dritten Screening-Durchgangs – Standard Mineralsalzmedium mit Zusatz von Edukt, Produkt und pH-Indikatoren

Anreicherungs-medium	Medienbestandteile	Zusammensetzung der Konzentrationsstufen [g/L]		Zweck / Selektivität
		niedrig	hoch	
A	Rohglycerin	30	30	Rohglycerin-Verwertung
	1,3-Propandiol	60	80	1,3-Propandiol-Toleranz
	Hefeextrakt	0,05	0,05	Geringer Supplin-Bedarf
	Phenolrot	0,02	0,02	Nachweis metabolischer Aktivität
B	Rohglycerin	30	30	Rohglycerin-Verwertung
	1,3-Propandiol	60	80	1,3-Propandiol-Toleranz
	Vitaminlösung DSMZ 141	5 mL/L	5 mL/L	Geringer Supplin-Bedarf
	Phenolrot	0,02	0,02	Nachweis metabolischer Aktivität

Die Anreicherungsmedien A und B wurden in zwei Konzentrationsstufen verwendet. Um Wachstum sicherzustellen, wurde für die aktuelle Anreicherung 60 g/L als niedrige 1,3-Propandiol-Konzentration eingesetzt. Gleichzeitig wurde ein weiteres Anreicherungsmedium mit 80 g/L 1,3-Propandiol-Vorlage eingesetzt.

Rohglycerin (Charge 2) wurde als einzige Kohlenstoffquelle verwendet. Es wurde in einer erhöhten Konzentration von 30 g/L eingesetzt. Auf Grund der Erfahrungswerte aus dem letzten Screening, kann diese Menge komplett umgesetzt werden. Zusätzlich zu den bisher verfolgten Stammanforderungen sollte in diesem Screening-Durchgang gezielt nach Stämmen gesucht werden, die einen geringen Bedarf an Supplinen haben. Hierzu wurde die eingesetzte Menge an Hefeextrakt auf ein zwanzigstel des ursprünglichen Wertes verringert. Alternativ wurde ein Medium eingesetzt, bei dem der Hefeextrakt vollständig durch eine definierte Vitaminlösung ersetzt wurde.

1,3-Propandiol wurde direkt mittels HPLC nachgewiesen. Die Dauer der Analyse beträgt 10 min, so dass bei einer hohen Anzahl an Proben dies der Zeit-limitierende Faktor im Screening ist. Die 1,3-Propandiol-Bildung dient dem Mikroorganismus zur Rückgewinnung der Reduktionsäquivalente (vgl. Kapitel 2.2.7), die Energiegewinnung aus Glycerin erfolgt über die Bildung einer Reihe von Nebenprodukten (vgl. Abbildung 2.4). Eine Absenkung des pH-Wertes ist bei der Bildung großer Mengen an 1,3-Propandiol wahrscheinlich, da zumindest geringe Mengen organischer Säuren gebildet werden. Im aktuellen Screening sollte die metabolische Aktivität einzelner Anreicherungskulturen (Wells der DWP) zunächst in einem Schnellnachweis qualitativ über die Absenkung des pH-Wertes visualisiert werden. Nur die aktiven Kulturen wurden anschließend mittels HPLC genauer untersucht. Hierzu wurde dem Medium die Indikatorfarbstoffe Phenolrot bzw. Bromthymolblau gemäß Kapitel 3.3.2 zugesetzt. Die pH-Werte können so mittels eines Photospektrometers für Mikrotiterplatten über die Absorption bestimmt werden.

Es wurden 44 Proben zur Anreicherung eingesetzt (Erde (16), Kompost (23), Tiermist (3), Gewässersediment (1), Wein (1); vgl. Tabelle 7.6). Die Umweltproben wurden in beiden Anreicherungsmedien eingesetzt, bei Wachstum in dem selektiveren Medium hatten diese Anreicherungskulturen bei der Auswahl zur Vereinzelung den Vorrang. Die Proben wurden an Substrat-reichen Standorten entnommen, an denen bereits eine hohe Bakteriendichte durch natürliche Anreicherung vorhanden war (Kompost, Sediment, Mist) bzw. an denen pflanzliche Öle und deren Abbauprodukte vorlagen (z. B. Ackerböden von Ölpflanzen, Kompost). Die Proben waren in Körnung, Feuchtigkeitsgrad und Anteil an Pflanzenteilen sehr heterogen. Da der Anreicherungsmaßstab und damit die Öffnung der Kultivierungsgefäße (Wells der DWP) sehr klein waren, musste eine Probenvorbehandlung stattfinden. Die Proben wurden getrocknet, gesiebt und in anaerobisierter, physiologischer Kochsalzlösung suspendiert (Konzentration 2 g/mL) und anschließend pasteurisiert. 200 µL der Suspension wurden an-

schließlich unter anaeroben Bedingungen mit einer Pipette in die Wells der DWP eingebracht und mit 1800 μ L des Anreicherungsmediums überschichtet.

Die Verringerung des Maßstabes ermöglichte eine erheblich größere Anzahl an gleichzeitig kultivierbaren Anreicherungen als in den vorherigen Screening Durchgängen. Durch die stark selektiven Bedingungen wurde nur eine geringe Anzahl an aktiven Anreicherungskulturen erwartet, welche schnell über die Absenkung des pH-Wertes mittels pH-Indikator identifiziert wurden. So konnten die insgesamt 4 unterschiedlichen Anreicherungsmedien mit den ausgewählten Umweltproben im Doppelansatz beimpft werden.

Nach einer Inkubation von 7 d wurde der pH-Wert des Kulturüberstands photospektrometrisch ermittelt. Es kam zu einem geringen Anteil falsch positiver Ergebnisse, vermutlich durch Zerfall oder mikrobiellen Abbau des pH-Indikators, daher wurden die pH-Werte mit einer Änderung über 0,5 manuell überprüft. Die Überstände metabolisch aktiver Kulturen wurden mittels HPLC untersucht. Alle Kulturen, unabhängig von der metabolischen Aktivität, wurden auf frisches Medium der gleichen Zusammensetzung übertragen. Durch den Einsatz von Mehrkanalpipetten erbrachte dies eine erhebliche Zeitersparnis und vermied Fehler und Kreuzkontamination. Der zusätzliche Materialaufwand war durch den kleinen Maßstab gering. Die Anreicherungskulturen wurden dreimal auf frisches Medium übertragen. Zu diesem Zeitpunkt der Anreicherung zeigten 30 Anreicherungskulturen eine Absenkung des pH-Wertes, die größer als 0,5 war. Die Gesamtzahl der beimpften Anreicherungskulturen betrug 352, von denen somit nur 8,5 % Wachstum aufwiesen. Darunter war nur eine Kultur (Anreicherung 3a-25) mit der höheren 1,3-Propandiol-Vorlage von 80 g/L. Die Ergebnisse der vierten Anreicherungskultur sind in Tabelle 4.16 dargestellt.

Diese bewachsenen Anreicherungskulturen waren lediglich aus elf unterschiedlichen Umweltproben hervor gegangen, bei allen Proben handelt es sich um Kompost (Herkunft vgl. Anhang Tabelle 7.6). 20 der Kulturen waren redundant vorhanden (10 x Doppelansatz). Nur in 6 Anreicherungskulturen konnte eine 1,3-Propandiol-Produktion gemessen werden, die größer als 2 g/L war. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von ca. 1,7 %. Die Anreicherung 3a-8, 3a-12 und 3a-18 waren mit den Proben 22, 29 und 33 beimpft, bei denen es sich um Haushaltskompost handelte. Die anderen drei Anreicherungen (3a-23, 3a-25, 3a-27) waren alle mit derselben Probe (44, reifer Kompost mit Sand) beimpft, unterschieden sich aber in der Zusammensetzung des Anreicherungsmediums. In den anderen Anreicherungskulturen kam es vermehrt zur Bildung von Essig- und Propionsäure.

Die Anreicherungsmedien waren sehr selektiv, so dass nur ein geringer Anteil der Kulturen Wachstum zeigte. Ebenfalls kann die Probenvorbehandlung (Trocknung und Siebung), die in diesem Screening neu eingeführt wurde, einen Einfluss haben. Zudem war die eingesetzte Menge an Inokulum pro Well mit 100 mg relativ gering. Vier Anreicherungskulturen wurden für eine Vereinzelung auf Festmedium ausgewählt (in Tabelle 4.16 grau hinterlegt).

Tabelle 4.16: Übersicht über die Anreicherungskulturen, Kultivierungshergang und Ergebnisse der vierten Anreicherungskultur - 7 d Kultivierung in DWP (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)

Nr.	Anreicherungs- medium	Umwelt- probe	pH-Wert	Glycerin- Verbrauch [g/L]	1,3-PD- Bildung [g/L]	Ausbeute [g/g]
3a-1	RG 30 60 _{vit}	15	5,78	6,5	1,4	0,21
3a-2	RG 30 60 _{HE}	19	5,76	8,5	1,2	0,14
3a-3	RG 30 60 _{HE}		5,71	7,1	0,4	0,06
3a-4	RG 30 60 _{vit}		5,72	8,3	1,7	0,20
3a-5	RG 30 60 _{vit}		5,81	6,6	1,3	0,20
3a-6	RG 30 60 _{HE}	22	5,62	10,3	1,1	0,11
3a-7	RG 30 60 _{HE}		5,84	7,9	0,9	0,11
3a-8	RG 30 60 _{vit}		5,82	5,8	2,0	0,34
3a-9	RG 30 60 _{vit}		6,38	4,5	1,1	0,24
3a-10	RG 30 60 _{HE}	29	5,78	6,8	0,2	0,04
3a-11	RG 30 60 _{HE}		5,90	6,8	0,2	0,03
3a-12	RG 30 60 _{vit}		5,85	6,7	2,0	0,30
3a-13	RG 30 60 _{HE}	31	5,45	11,3	1,8	0,16
3a-14	RG 30 60 _{HE}	32	n. b.	8,2	0,1	0,01
3a-15	RG 30 60 _{HE}		5,60	8,9	0,4	0,04
3a-16	RG 30 60 _{vit}		5,85	6,3	1,2	0,19
3a-17	RG 30 60 _{vit}		5,80	6,4	1,3	0,20
3a-18	RG 30 60 _{HE}	33	5,42	16,4	7,5	0,46
3a-19	RG 30 60 _{HE}	42	5,74	7,3	0,0	0,00
3a-20	RG 30 60 _{vit}		6,00	5,4	0,9	0,17
3a-21	RG 30 60 _{vit}	43	5,85	6,1	1,5	0,25
3a-22	RG 30 60 _{vit}		5,87	5,6	1,1	0,20
3a-23	RG 30 60 _{HE}	44	6,15	17,0	7,7	0,46
3a-24	RG 30 60 _{HE}		5,54	9,8	0,5	0,05
3a-25	RG 30 80 _{HE}		6,70	7,6	2,5	0,32
3a-26	RG 30 60 _{vit}		5,46	9,2	1,6	0,17
3a-27	RG 30 60 _{vit}		6,04	15,9	7,7	0,48
3a-28	RG 30 60 _{HE}	45	5,69	6,2	0,7	0,11
3a-29	RG 30 60 _{vit}		6,12	13,1	1,7	0,13
3a-30	RG 30 60 _{vit}		5,97	7,6	1,7	0,22

Die Anreicherungskultur 3a-25 zeigte bei einer Produktvorlage von 80 g/L 1,3-Propandiol-Bildung. Bei Inokulation einer neuen Kultur konnte erneut Wachstum eine 1,3-Propandiol-Bildung von 3,4 g/L festgestellt werden. Diese Kultur wurde zur Kolonie-Evaluierung eingesetzt.

Im Laufe der Anreicherung kam es in einigen Kulturen wiederholt zu Problemen beim Wachstum. Kulturen, die 1,3-Propandiol bildeten, zeigten nach Übertragung in frisches Medium kein Wachstum mehr. Dies wurde, wie spätere Untersuchungen an den Reinkulturen

zeigten (vgl. Kapitel 4.5.2), durch die Anwesenheit des toxischen Metaboliten 3-Hydroxypropionaldehyd in den Anreicherungskulturen verursacht. Die Anreicherungskulturen 3a-18, 3a-23 und 3a-27 zeigten gute 1,3-Propandiol-Bildung (>7 g/L). Da ihr Wachstum unter den gegebenen Bedingungen in Flüssigkultur gehemmt war, wurden sie wie im konventionellen Screening, direkt auf Festmedium vereinzelt und Reinkulturen isoliert.

4.3.3 Screening 3b – Variation der Sauerstoffbedingungen

Im Rahmen des Scale-down wurde ebenfalls eine weitere Stammeigenschaft, die Sauerstoff-Toleranz (vgl. Tabelle 4.9), berücksichtigt. Bei Kultivierung im Bioreaktor müsste so kein Stickstoff zur Begasung des Mediums oder des Feed-Stroms verwendet werden, wodurch die Prozessführung eines industriellen Prozesses vereinfacht werden könnte. Dies führt zu geringeren Investitions- und Energiekosten (Liu et al., 2007). Sauerstoff unempfindliche Stämme sind zudem einfacher von der Handhabung. So ist bei *Clostridium butyricum* nachgewiesen, dass gerade in der Startphase einer Kultivierung ein zu hoher Sauerstoffgehalt im Medium das Wachstum komplett hemmen kann (Kawasaki et al., 1998). Ein solcher Ausfall kann im industriellen Maßstab zu erheblichen finanziellen Einbußen führen.

Das Screening-Verfahren wurde analog dem Verfahren 3a (vgl. Kapitel 4.3.2) durchgeführt. Um die Sauerstofftoleranz zu fördern, wurden die Kulturen jedoch unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Anreicherungsbedingungen sind in Tabelle 4.17 zusammengefasst.

Tabelle 4.17: Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 3b

Parameter	Anreicherungsbedingungen
Anreicherungsmaßstab	2,2 mL DWP; 2 mL Arbeitsvolumen (Kapitel 3.2.4.2)
Temperatur	32°C
Durchmischung	unbewegte Suspensionskultur, Verhinderung von Konvektion durch Zugabe von Agar-Agar
Sauerstoffbedingungen	aerob (Kultivierung bei Raumluftatmosphäre)
Inokulum	Umweltproben
Probenmaterial	11 Proben, Erd- / Kompost Proben; Deutschland und Indonesien
Vorbehandlung	Trocknung (7d, 40°C) Siebung (Porengröße: 0,75 - 1,5 mm) Pasteurisieren (30 min; 60 °C)
Probenkonzentration	50 g/L
Anreicherungsmedium	Mineralsalzmedium (Kapitel 3.1.2)
Hefeextrakt oder Vitaminlösung DSMZ 141	1/20 Hefeextrakt Ersatz für Hefeextrakt
pH-Indikator	Phenolrot bzw. Bromthymolblau
Agar-Agar	0,3 %
Glycerinqualität	Rohglycerin (Charge 2; Kapitel 3.1.4)
Produkt-Zusatz	1,3-Propandiol

Neun der im vorherigen Screening verwendeten Umweltproben wurden hier ebenfalls verwendet, zuzüglich zweier Proben aus dem Screening 2 (Herkunft vgl. Anhang Tabelle 7.6). Es handelte sich vorwiegend um Bodenproben oder oberflächennah entnommenen Kompost, Standorte, die sowohl anaerobe als auch aerobe Bereiche aufweisen.

Die gleichen Anreicherungsmedien wie in Screening-Durchgang 3a wurden verwendet (vgl. Tabelle 4.15). Um die Umschichtung der Kultursuspension bei Transport und während der Kultivierung zu minimieren, wurden diese mit 0,3 % Agar-Agar verfestigt. Dies sollte den Eintrag von Sauerstoff in anaerobe Zonen der Kultur verringern.

Die vorbehandelten suspendierten Umweltproben (vgl. Kapitel 4.3.2) wurden unter anaeroben Bedingungen in die DWP eingebracht und mit dem Medium überschichtet. Die Kulturen wurden anschließend bei Raumluft inkubiert. Dieses Vorgehen sollte zu Bereichen in der Kultur mit anaeroben Nischen führen, in denen 1,3-Propandiol-Produktion möglich ist. Das Material der DWP (Polypropylen) ebenso wie die zur Abdeckung der DWP verwendete Viskose-Folie und der Polystyrol-Deckel der MTP (vgl. Abbildung 3.5) sind jedoch Sauerstoffdurchlässig. So sollten Sauerstoff-tolerante Stämme angereichert werden. Die Kulturen wurden, analog zum Screening 3, nach 7d unter anaeroben Bedingungen überimpft. Hierbei wurde die Zellsuspension zunächst mittels einer Pipette homogenisiert, um zu gewährleisten, dass Zellen aus allen Bereichen in die neue Kultur übertragen wurden. Nach viermaligem Überimpfen wurde nichtverfestigtes Medium inokuliert, um eine Untersuchung mittels HPLC zu ermöglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.18 dargestellt.

Acht der elf verwendeten Umweltproben erbrachten aktive Anreicherungskulturen. 28 Kulturen zeigten eine Absenkung des pH-Wertes, die größer als 0,5 war. Insgesamt waren 88 Kulturen beimpft worden, der aktive Anteil betrug somit 32 %. Lediglich vier Kulturen produzierten mehr als 2 g/L 1,3-Propandiol, dies sind bezogen auf die Gesamtanzahl nur ca. 4,5 %. Im Gegensatz zum anaeroben Scale-down kam es beim aeroben Vorgehen zu Wachstum in Anreicherungsmedien mit der höheren 1,3-Propandiol-Konzentration. Insgesamt 7 Kulturen beinhalten eine 1,3-Propandiol-Startkonzentration von 80 g/L. In den anderen Anreicherungskulturen wurde neben geringen Mengen an 1,3-Propandiol hauptsächlich Essig- und Propionsäure gemessen. Auffällig war, dass in einzelnen Kulturen unter aeroben Bedingungen auch Bernsteinsäure nachgewiesen werden konnte.

Im Vergleich mit dem anaeroben Screening (vgl. Kapitel 4.3.2) ist der Anteil der aktiven Kulturen, sowohl mit 60 als auch mit 80 g/L vorgelegtem 1,3-Propandiol, und der Anteil der positiv angereicherten Umweltproben erheblich höher. Der Anteil der 1,3-Propandiol-bildenden Kulturen ist jedoch nicht wesentlich erhöht. Zudem fällt auf, dass die Ausbeuten und erreichten Endkonzentrationen in den aeroben Kulturen deutlich niedriger sind als bei anaerober Anreicherung (vgl. Tabelle 4.16). Dies lässt darauf schließen, dass die Anreicherung unter aeroben Bedingungen eine geringere Selektivität für 1,3-Propandiol-Bildner aufweist.

Tabelle 4.18: Übersicht über die Anreicherungskulturen, Kultivierungshergang und Ergebnisse der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung in DWP (Mineralsalzmedium, 32°C, aerob, ungeschüttelt)

Nr.	Anreicherungs- medium	Umwelt- probe	pH-Wert	Glycerin- Verbrauch [g/L]	1,3-PD- Bildung [g/L]	Ausbeute [g/g]
3b-1	RG 30 60 _{vit}	3	6,85	5,3	1,9	0,37
3b-2	RG 30 60 _{vit}		5,93	16,8	2,9	0,18
3b-3	RG 30 80 _{vit}		6,57	7,7	0	0,00
3b-4	RG 30 80 _{vit}		6,41	13,6	0,6	0,04
3b-5	RG 30 60 _{HE}		6,26	12,5	1,3	0,10
3b-6	RG 30 60 _{HE}		5,71	16,5	2,6	0,16
3b-7	RG 30 60 _{vit}	4	5,86	13,8	1,7	0,12
3b-8	RG 30 60 _{vit}		5,40	6,5	0,3	0,05
3b-9	RG 30 80 _{vit}		6,19	11,4	0,6	0,06
3b-10	RG 30 60 _{HE}		5,38	15,4	1,2	0,08
3b-11	RG 30 60 _{HE}		5,49	14,1	0,7	0,05
3b-12	RG 30 80 _{HE}		6,26	12,5	1,2	0,10
3b-13	RG 30 80 _{vit}	10	6,65	12,4	0,9	0,07
3b-14	RG 30 60 _{HE}		5,70	12,0	1,5	0,13
3b-15	RG 30 60 _{vit}	26	6,63	13,1	0	0,00
3b-16	RG 30 60 _{HE}		5,62	11,3	1,5	0,13
3b-17	RG 30 60 _{HE}		5,56	12,3	1,3	0,10
3b-18	RG 30 60 _{vit}	35	5,56	9,1	0,1	0,02
3b-19	RG 30 60 _{HE}		5,56	10,5	0,9	0,08
3b-20	RG 30 60 _{HE}		6,37	8,9	0,4	0,05
3b-21	RG 30 60 _{HE}	39	6,12	12,9	0,7	0,05
3b-22	RG 30 60 _{HE}	43	6,13	15,1	2,9	0,19
3b-23	RG 30 60 _{HE}		6,05	7,2	0,7	0,10
3b-24	RG 30 60 _{vit}	45	6,44	6,7	1,2	0,18
3b-25	RG 30 80 _{vit}		5,72	7,3	0,9	0,13
3b-26	RG 30 80 _{vit}		6,19	9,1	0,4	0,04
3b-27	RG 30 60 _{HE}		5,51	11,5	0,8	0,07
3b-28	RG 30 60 _{HE}		5,82	28,1	10,8	0,38

Die 1,3-Propandiol-Konzentrationen der Anreicherungskulturen waren zumeist sehr niedrig. Um eine Auswahl zu erleichtern wurden die Anreicherungskulturen im letzten Schritt auf ein Kultivierungsmedium mit 25 g/L Rohglycerin und ohne 1,3-Propandiol-Vorlage überimpft, um höhere Produktkonzentrationen zu erreichen. Die Ergebnisse der Kultivierungen, die für eine Vereinzelung auf Festmedium ausgewählt wurden, sind in Tabelle 4.19 zusammengefasst. Die Anreicherungskulturen wurden im nächsten Schritt auf Festmedium sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen vereinzelt.

Tabelle 4.19: Übersicht über Anreicherungskulturen zur Vereinzelung - 7 d Kultivierung in DWP (Mineralsalzmedium, 32°C, aerob, ungeschüttelt)

Nr.	Umweltprobe	Anreicherungsmedium	Ergebnisse der letzten Anreicherung			
			Kulturmedium	Glycerin-Verbrauch [g/L]	1,3-PD-Bildung [g/L]	Ausbeute [g/g]
3b-1	3	RG 30 60 _{vit}	RG 25 0 _{vit+HE}	13,4	4,4	0,33
3b-11	4	RG 30 60 _{HE}	RG 25 0 _{vit+HE}	17,6	6,0	0,34
3b-17	26	RG 30 60 _{HE}	RG 25 0 _{vit+HE}	15,7	4,7	0,30
3b-22	43	RG 30 60 _{HE}	RG 25 0 _{vit+HE}	16,1	4,2	0,26
3b-28	45	RG 30 60 _{HE}	RG 25 0 _{vit+HE}	20,7	7,1	0,34
3b-28	45	RG 30 60 _{HE}	RG 25 0 _{vit+HE}	21,2	8,2	0,38

4.3.4 Screening 4 – Gruppierte Anreicherungskultur

Ziel dieses Screening war erneut ein hoher Durchsatz an Umweltproben. Dies sollte, anders als im vorherigen Screening (vgl. Kapitel 4.3.2), nicht durch eine Verkleinerung des Maßstabes erfolgen, sondern durch eine vereinfachte Anreicherungsphase. Diese ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

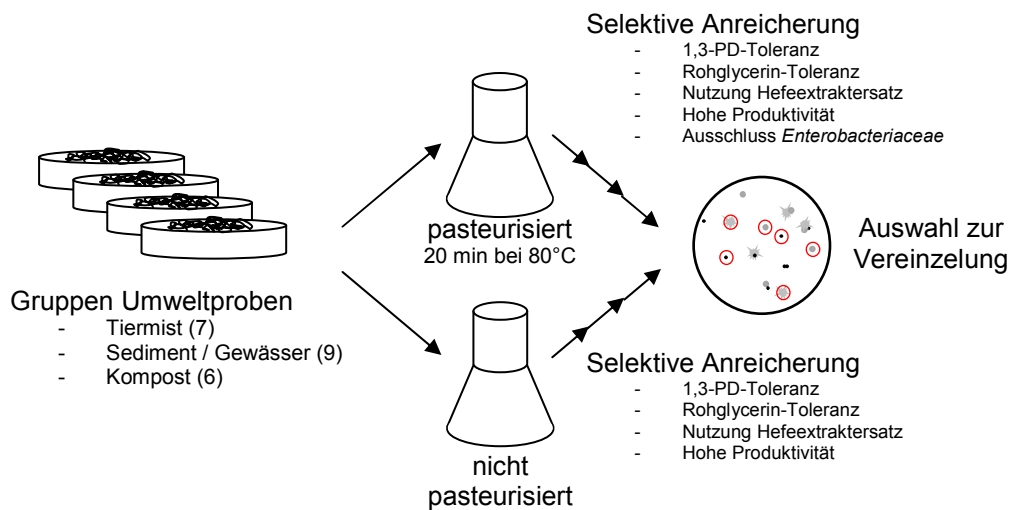


Abbildung 4.17: Gruppierte Anreicherungskultur - Screening-Durchgang 4

Die Umweltproben wurden thematisch in drei Gruppen eingeordnet, Tiermist, Sediment aus Gewässern und Kompost (Herkunft vgl. Anhang Tabelle 7.7). Die Gruppierung erfolgte entsprechend der Herkunft. Die Wahrscheinlichkeit, einen pathogenen Mikroorganismus zu isolieren, ist wesentlich von der Herkunft der Proben abhängig (vgl. Kapitel 2.1.2). Die Umweltproben einer Gruppe wurden daher gemeinsam als Inokulum für eine Anreicherungskultur verwendet. Um die Anzahl der Anreicherungskulturen klein zu halten wurde zudem nur ein Anreicherungsmedium (vgl. Tabelle 4.21) eingesetzt. Dieses Vorgehen basierte auf der Prämisse, dass bei stark selektiven Anreicherungsbedingungen nur bei einer geringen An-

zahl der in den Proben vorliegenden Spezies Wachstum möglich ist. Schnell wachsende Spezies haben einen Vorteil gegenüber langsam wachsenden.

Die Anreicherungsparameter des vierten Screening-Durchgangs sind in Tabelle 4.20 zusammengefasst.

Tabelle 4.20: Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 4

Parameter	Anreicherungsbedingungen
Anreicherungsmaßstab	100 mL Schüttelkolben, 50 mL Arbeitsvolumen (vgl. Kapitel 3.2.3)
Temperatur	32°C
Durchmischung	350 upm
Sauerstoffbedingungen	anaerob (Kultivierung in Anaerobierbank, Stickstoffatmosphäre)
Inokulum	Umweltproben
Probenmaterial	22 Proben aus Deutschland; Gruppierung: Tiermist, Kompost, Sediment / Gewässer
Vorbehandlung	z. T. Pasteurisieren (20 min; 80 °C)
Probenkonzentration	5 g/L je Probe
Anreicherungsmedium	Mineralsalzmedium (Kapitel 3.1.2)
Hefeextraktersatzstoffe	Maiskleber, Weizenkleber, Kartoffelprotein, Sojaproteinkonzentrat
pH-Indikator	Phenolrot bzw. Bromthymolblau
Glycerinqualität	Rohglycerin (Charge 3; Kapitel 3.1.4)
Produkt-Zusatz	1,3-Propandiol
pH-Pufferung	CaCO ₃

Es wurden zwei Anreicherungskulturen pro Probengruppe inokuliert. Je eine pasteurisierte und eine nicht pasteurisierte Anreicherungskultur wurde inkubiert. Die Temperatur der Pasteurisierung wurde, im Vergleich zum bisherigen Vorgehen, um 20 °C auf 80 °C erhöht, da im Screening 3, trotz Probenvorbehandlung, pathogene Bakterienstämme isoliert worden waren (vgl. Kapitel 4.6).

Selektionskriterien waren, wie zuvor, Produkttoleranz und Rohglycerin-Nutzung. In diesem Screening wurde Rohglycerin einer anderen Zusammensetzung (Charge 3) verwendet als in den vorherigen Durchgängen, da der Herstellungsprozess für Biodiesel geändert worden war (vgl. Kapitel 3.1.4). Die eingesetzte Konzentration wurde für eine verbesserte Toleranz gegenüber dem Rohglycerin nochmals verdoppelt. Die verwendeten Anreicherungsmedien sind in Tabelle 4.21 dargestellt. In diesem Screening-Durchgang wurde nur ein Anreicherungsmedium verwendet. Hierin wurden gleichzeitig vier unterschiedliche Ersatzstoffe für den Hefeextrakt eingesetzt. Es handelte sich um komplexe Substrate aus der Tierfuttermittelindustrie, die sich in Untersuchungen mit den Reinkulturen AKR17a und AKR102a als geeignet erwiesen haben (vgl. Kapitel 3.1.5). So sollten bevorzugt Stämme angereichert werden, die einen oder mehrere dieser günstigen Ersatzstoffe gut verwerten konnten. Zusätzlich wurden in diesem Screening Stämme mit einer hohen Produktivität gesucht. Dies sollte verwirklicht werden, indem die Anreicherungskulturen während der Produktions-

phase überimpft wurden. Um diese zu verlängern, wurde das in Kapitel 4.2.1 für den Schüttelkolben optimierte pH-Puffersystem eingesetzt. Bromthymolblau wurde als pH-Indikator zur schnellen optischen Einschätzung der Aktivität der Anreicherungskulturen verwendet.

Tabelle 4.21: Anreicherungsmedium des 4. Screening-Durchgangs – Standard Mineralsalzmedium mit Zusatz von Edukt, Produkt, Hefeextraktersatzstoffen und pH-Indikatoren

Medienbestandteile	Zusammensetzung [g/L]	Zweck / Selektivität
Rohglycerin	60	Rohglycerin-Verwertung Rohglycerin-Toleranz
1,3-Propandiol	60	1,3-Propandiol-Toleranz
Hefeextraktersatz	1 (Summe)	
Weizenkleber	0,25	
Maiskleber	0,25	Verwertung preiswerter Ersatzstoffe
Sojaproteinkonzentrat	0,25	
Kartoffelprotein	0,25	
CaCO ₃	30	Verlängerte Produktionsphase
Bromthymolblau	0,02	Nachweis metabolischer Aktivität

Keine der pasteurisierten Erdproben verursachte Wachstum in den Anreicherungskulturen. Unter den gegebenen Bedingungen fand somit keine Anreicherung von Mikroorganismen aus Dauerformen statt. Von den nicht pasteurisierten Anreicherungskulturen zeigten zwei der drei Anreicherungskulturen Wachstum und 1,3-Propandiol-Bildung. Es handelte sich um die Gruppierungen Kompost und Sediment / Gewässer. Hier wurden demnach vegetativ vorliegende Mikroorganismen, oder Spezies, die temperaturempfindliche Sporen bilden, angereichert. Die mit Tiermist beimpften Anreicherungskulturen zeigten kein Wachstum. Dies kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die Mikroorganismen dort an hohe Nährstoffkonzentrationen angepasst sind (Beauprez et al., 2010). Im Screening-Medium lagen jedoch nur Ersatzstoffe für Hefeextrakt in relativ geringen Mengen vor (vgl. Tabelle 4.21).

Durch die verbesserte pH-Pufferung waren deutlich längere Produktbildungsphasen und höhere Endkonzentration möglich. Als Beispiel sind die Ergebnisse der zweiten Anreicherungskultur nach 66 h in Tabelle 4.22 dargestellt.

Tabelle 4.22: Übersicht über die Anreicherungskulturen des Screening-Durchgang 4 - Ergebnisse der zweiten Anreicherungskultur – 66 h Kultivierung in Schüttelkolben (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, 350 upm)

Proben-Gruppe	pH-Wert	Glycerin-Verbrauch [g/L]	1,3-PD-Konzentration [g/L]	1,3-PD-Bildung [g/L]	Ausbeute [g/g]
Sediment / Gewässer	6,42	55,3	92,1	32,4	0,59
Kompost	6,75	57,9	90,9	27,8	0,48

Es wurden bei einer Vorlage von 60 g/L 1,3-Propandiol in beiden Kulturen bereits nach 66 h ca. 30 g/L 1,3-Propandiol gebildet. Dies ergibt, bei Berücksichtigung der 1,3-Propandiol-Vorlage, Konzentrationen von über 90 g/L und deutet auf eine hohe Produkt-Toleranz der angereicherten 1,3-Propandiol-Produzenten hin. Der pH-Wert lag dabei oberhalb des gehemmten Bereiches (vgl. Kapitel 2.3.3). In den Anreicherungsphasen der vorherigen Screening-Durchgänge lag die 1,3-Propandiol-Bildung meist unterhalb von 15 g/L (vgl. Kapitel 4.1.1, 4.3.1 und 4.3.2).

Die Kulturen wurden in der Regel frühzeitig bei nachgewiesener Produktbildung (ca. 2 bis 3 d) auf frisches Medium überimpft. So sollten schnell wachsende Bakterienstämme angereichert und gleichzeitig eine Hemmung bzw. Inaktivierung der angereicherten Zellen durch toxische Metabolite verhindert werden (z. B. 3-HPA, vgl. Kapitel 4.5.2).

Die Anreicherungskulturen wurden zwei- bis dreimal auf frisches Medium überimpft. Im letzten Schritt wurde auf die Zugabe von Calciumcarbonat als zusätzliche pH-Puffersubstanz verzichtet, um die Vereinzelung auf Festmedium zu erleichtern. Die Ergebnisse der für die Vereinzelung verwendeten Kulturen sind in Tabelle 4.23 zusammengefasst.

Tabelle 4.23: Übersicht über Anreicherungskulturen zur Vereinzelung, Ergebnisse und Anreicherungs-hergang – Kultivierung im Schüttelkolben (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, 350 upm)

Proben-Gruppe	über-impft	Inkubations-dauer	Carbonat Pufferung	pH-Wert	Glycerin-Verbrauch [g/L]	1,3-PD-Bildung [g/L]	Ausbeute [g/g]
Sediment / Gewässer	2x	48	+	6,85	47,9	17,9	0,37
Sediment / Gewässer	3x	24	-	7,08	-	-	-
Kompost	3x	24	-	5,35	18,5	8,9	0,48

Die Anreicherungskultur der Proben-Gruppe Sediment / Gewässer ohne Calciumcarbonat-Zugabe zeigte nach 24 h Wachstum, zum Zeitpunkt der Vereinzelung auf Festmedium, noch keine nachweisbaren Änderung der Edukt- bzw. Produktkonzentration. Deshalb wurde zusätzlich die vorherige Anreicherungskultur (mit Calciumcarbonat-Pufferung) zur Vereinzelung verwendet.

4.3.5 Zusammenfassung – Variation der Anreicherungsphase

Ziel der Variation der Anreicherungsphase war es, die Selektivität zu erhöhen, um die wesentlichen Anforderungen an einen industriellen Produktionsstamm umzusetzen. Der Stamm sollte nicht pathogen sein, Rohglycerin verwerten, eine hohe Produkttoleranz und geringe Nährstoffansprüche aufweisen. Gefragt waren auch leichte Handhabung, geringe Sauerstoffempfindlichkeit und hohe Produktivität sowie Ausbeute.

Weiter sollte die Anreicherung einen hohen Durchsatz an Umweltproben erlauben, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wurde, einen Hochleistungsproduzenten zu isolieren.

Die Selektivität wurde vorwiegend durch die Variation der Medienzusammensetzung ermöglicht. Rohglycerin, welches in einem späteren industriellen Prozess zum Einsatz kommen soll, wurde zur Anreicherung eingesetzt. Die Zugabe des Hauptproduktes 1,3-Propandiol in hohen Konzentrationen und z. T. der Nebenprodukte ermöglichte nur Wachstum Produkt-toleranter Stämme. Die Selektivität des Screenings konnte über die Zugabe der Produkte gut eingestellt werden. Die Zugabe von 1,3-Propandiol in einer Konzentration von 70 g/L erwies sich als ausreichend selektiv.

Die organischen Säuren hatten keinen messbar hemmenden Einfluss. Zudem besteht die Gefahr, Mikroorganismen anzureichern, die diese als Kohlenstoffquelle nutzen oder Mikroorganismen mit anderen Nebenprodukten könnten unterdrückt werden. Daher wurden Nebenprodukte in den weiteren Screening-Verfahren nicht wieder eingesetzt.

Das Anreicherungsmedium wurde weiter hinsichtlich der Nährstoffzugabe variiert. Der standardmäßig eingesetzte Hefeextrakt wurde in seiner Konzentration auf ein zwanzigstel verringert oder ersetzt durch definierte Vitaminlösung oder preisgünstige Ersatzstoffe aus der Tierfuttermittelindustrie. Die Anreicherung war auch in Medien mit veränderter Nährstoffzugabe erfolgreich. Eine Beurteilung der Auswirkungen auf die angereicherten Mikroorganismen kann erst in der Evaluierung der Reinkulturen getroffen werden.

Getestet wurde auch eine Anreicherung unter aeroben Bedingungen, um 1,3-Propandiol-Produzenten zu isolieren, die tolerant gegenüber Sauerstoff sind. Dies könnte die industrielle Prozessführung vereinfachen und für eine bessere Reproduzierbarkeit sorgen. Obgleich die Anreicherung hier wesentlich weniger selektiv verlief als unter anaeroben Bedingungen, konnten 1,3-Propandiol-produzierende Anreicherungskulturen gewonnen werden.

Die Einstellung der Selektivität über die Zugabe des Produktes 1,3-Propandiol wurde durch die Variation des Anreicherungsmediums erreicht. So konnte der Anteil der aktiven Anreicherungsbedingungen begrenzt werden, wodurch ein erhöhter Durchsatz an gleichzeitig zu bearbeitender Umweltproben möglich wurde.

Der Durchsatz wurde durch die Verkleinerung des Anreicherungsmaßstabs erhöht. Es wurden DWP mit einem Arbeitsvolumen von 2 mL eingesetzt. Dies ermöglicht einen erheblich verringerten Platz- und Materialbedarf, erlaubte gleichzeitig die Beprobung mittels Mehrkanalpipetten und ermöglicht den Einsatz eines Roboter-Systems in späteren Arbeiten. Ein qualitativer Schnellauchweis metabolischer Aktivität wurde über einen pH-Indikator in den Anreicherungsmedien erreicht. So konnte die Anzahl der Proben, die in der HPLC vermessen werden sollten, erheblich verringert werden.

Ein weiteres Verfahren zur Erhöhung des Durchsatzes war die gemeinsame Anreicherung von Gruppen von Umweltproben in einer Anreicherungskultur. Dies erfolgte unter der Voraussetzung, dass der Großteil der anwesenden 1,3-Propandiol-Produzenten durch die sehr

selektiven Anreicherungsbedingungen gehemmt wird, während ausschließlich potenzielle Hochleistungsproduzenten angereichert werden.

Die Gruppierung erfolgte gemäß der Herkunft (Kompost, Tiermist, Sediment), da die Probenherkunft Einfluss auf die Pathogenität der anwesenden Mikroorganismen haben kann. Zudem kann so besser beurteilt werden, welche Gruppe sich für die Anreicherung von 1,3-Propandiol-Produzenten der gewünschten Anforderungen am besten eignet.

Durch die geringe Anzahl der Kulturen, war die Handhabung und Betreuung dieses Verfahrens sehr einfach. Durch Übertragung der Kulturen zu Beginn der Produktionsphase sollten schnell wachsende Mikroorganismen selektiert werden, um Stämme mit hoher Produktivität zu isolieren.

4.4 Optimierung der Aufreinigung - Kolonie-Evaluierung im Mikromaßstab

Im konventionellen Screening wurden die 1,3-Propandiol-bildenden Mikroorganismen durch Vereinzeln auf Festmedium aufgereinigt. Nach der Anreicherung liegt eine Mischkultur vor, die abhängig von der Selektivität der Anreicherungsbedingungen einen bestimmten Anteil an Mikroorganismen, die kein 1,3-Propandiol bilden, enthält. Auf Festmedium ist eine Unterscheidung zwischen 1,3-Propandiol-produzierenden Mikroorganismen und Begleitorganismen nicht möglich. Dies erhöht den Aufwand der Aufreinigung in Bezug auf Zeit und Material. Es stehen nur begrenzte Kapazitäten für die anaerobe Inkubation von Festmedien zur Verfügung, wodurch die Anzahl der Kolonien, die gleichzeitig aufgereinigt werden können, begrenzt ist. Dieses Verfahren galt es zu optimieren, wofür die Kolonie-Evaluierung entwickelt wurde. Einerseits sollte der Prozess selektiver gestaltet werden, um die zeitaufwendige Bearbeitung von Begleitorganismen zu minimieren. Andererseits sollte der Durchsatz der Kolonien, die auf ihre Aktivität getestet wurden, erhöht werden, um eine objektive Auswahl der Kolonien zu ermöglichen und die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen Hochleistungsproduzenten zu isolieren (vgl. Kapitel 2.1.4).

Die Anreicherungskultur wurde, wie im konventionellen Screening, auf Festmedium vereinzelt, danach wurden die vereinzelteten Kolonien ohne weitere Aufreinigung auf Flüssigmedium überimpft. Um eine hohe Anzahl an Kolonien gleichzeitig bearbeiten zu können, wurden die Kolonien unter anaeroben Bedingungen in DWP (1 mL Arbeitsvolumen pro Well) inkubiert. Diese Kulturen (Kolonie-Kulturen), die mehr als eine Spezies enthalten konnten, wurden im Schnelltest, in DWP im Einfachansatz, auf 1,3-Propandiol-Bildung und ihre Toleranzeigenschaften getestet. Diejenigen Kulturen, die gute Charakteristika zeigten wurden anschließend auf Festmedium aufgereinigt. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit, 1,3-Propandiol-Produzenten zu isolieren, erheblich erhöhen und eine schnelle Eliminierung der Kontaminanten erlauben.

4.4.1 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 2

Die neun ausgewählten Anreicherungskulturen aus dem Screening-Verfahren 2 (vgl. Tabelle 4.13) wurden vereinzelt und inkubiert. 80 Kolonien wurden als Inokulum ausgewählt und in einer DWP inkubiert. 18 der 80 getesteten Kulturen produzierten aus 50 g/L Rohglycerin 1,3-Propandiol im Bereich von 1,3 bis 14,6 g/L. Diese Kulturen wurden in zwei weiteren Kultivierungsmedien getestet. Einerseits wurden die Kulturen auf ihre 1,3-Propandiol-Produktion aus 100 g/L Rohglycerin getestet. Hierzu wurde das verbesserte pH-Puffer-System (vgl. Kapitel 4.1.4) eingesetzt, um die Produktionsleistung der Kulturen besser einschätzen und vergleichen zu können. Andererseits wurde die mittlere Konzentrationsstufe des Anreicherungsmedium 2 (Tabelle 4.12) als Maß für die 1,3-Propandiol-Toleranz eingesetzt. Da es sich um einen Schnelltest (Einfachansatz) mit geringer statistischer Sicherheit handelte, wurden die Ergebnisse in Kategorien eingeordnet und sind in Tabelle 4.24 dargestellt.

Tabelle 4.24 Ergebnisse der Kolonien-Evaluierung des Screenings 2 – Medien RG 50|0 (Inokulum von Festmedium), RG 100|0+CO₃, RG15|70 (Inokulum von DWP, 7 d anaerobe Inkubation in DWP, 32 °C, 350 upm) – Werte rechnerisch korrigiert

Anreicherung Nr.	Kolonie-Kultur	1,3-PD Produktion		Rohglycerin-Toleranz		1,3-PD-Toleranz	
		RG 50 0 C _{1,3-PD} [g/L]	Bewertung ^a	RG100 0+CO ₃ C _{1,3-PD} [g/L]	Bewertung ^b	RG15 70 ΔC _{1,3-PD} [g/L]	Bewertung ^a
2-11	50	11,2	++	24,2	++	8,4	++
2-11	51	7,1	++	27,9	++	2,4	+
2-6	73	9,8	++	32,4	+++	0,1	-
2-6	74	10,2	++	33,6	+++	n. b.	n. b.
2-6	76	4,5	+	21,5	++	n. b.	n. b.
2-6	77	6,0	+	21,0	++	0,0	-
2-6	78	3,1	+	16,3	+	n. b.	n. b.
2-8	80	6,3	+	38,3	+++	0,9	-
2-8	81	11,6	++	21,1	++	6,7	+
2-8	82	9,1	++	29,9	++	5,2	+
2-4	91	7,1	++	30,3	+++	0,0	-
2-4	92	5,7	+	32,6	+++	3,9	+
2-16	97	5,9	+	20,0	++	0,0	-
2-16	99	5,0	+	28,7	++	0,6	-
2-2	100	1,3	-	17,9	+	0,0	-
2-2	102	10,1	++	33,4	+++	4,9	+
2-2	103	12,2	+++	28,2	++	6,7	+
2-13	108	4,0	+	17,1	+	1,5	-

- schlecht; + gut; ++ sehr gut; +++ hervorragend; n. b.: nicht bewachsen

^a - < 2 g/L; + ≥ 2 g/L; ++ ≥ 7 g/L; +++ ≥ 12 g/L;

^b - <10 g/L; + ≥ 10 g/L; ++ ≥ 20 g/L; +++ ≥ 30 g/L;

Die Kolonien 50, 81, 82, 92, 102 und 103 zeigten eine gute 1,3-Propandiol-Produktion aus 100 g/L Rohglycerin und gleichzeitig Wachstum und Produktbildung in Gegenwart von 70 g/L

1,3-Propandiol. Auf Grund der hohen 1,3-Propandiol- und Rohglycerin-Toleranz wurden diese Kulturen ausgewählt für eine weitere Aufreinigung.

Die Isolate 80 und 91 zeigten kein Wachstum oder 1,3-Propandiol-Bildung in Gegenwart von 70 g/L 1,3-Propandiol. Sie waren jedoch in der Lage 100 g/L Rohglycerin zu verwerten. Diese Stämme bildeten 1,3-Propandiol in Mineralsalzmedium ohne Zugabe von Hefeextrakt (5,0 g/L 1,3-Propandiol in Kultur 80 und 11,8 g/L in Kultur 91 mit 50 g/L Rohglycerin). Da Hefeextrakt bzw. komplexe Medienbestandteile wesentlich zu den Rohstoffkosten einer Fermentation beitragen, wurden diese Kulturen ebenfalls zur weiteren Aufreinigung ausgewählt. Die ausgewählten Kulturen stammen aus den Anreicherungskulturen 2-4, 2-8 und 2-11, die mit der Umweltprobe 2 beimpft wurden und aus der Anreicherungskultur 2-2, die mit der Umweltprobe 1 beimpft wurde (vgl. Tabelle 4.11). Diese Bodenproben waren direkt durch Prozessabwasser einer Palmölraffinerie kontaminiert. Die Kulturen der Umweltprobe 3, bei der es sich bereits um rekultivierten Boden handelte, zeigten weniger gute Produktionseigenschaften. Dies könnte damit erklärt werden, dass hier die natürliche Vorselektion geringer war, da im Boden vorhandenes Substrat bzw. Verunreinigungen bereits teilweise abgebaut waren.

Die acht Kulturen wurden erneut pasteurisiert, um *Enterobacteriaceae* von dem zeitaufwendigen Aufreinigungsverfahren auszuschließen. Aus ihnen wurden 14 Reinkulturen auf Festmedium gewonnen. 10 Reinkulturen zeigten ebenfalls in Flüssigmedium Wachstum, die Ergebnisse sind in Tabelle 4.25 zusammengefasst.

Tabelle 4.25: Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium mit 25 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)

Herkunft / Anreicherung	Bezeichnung	pH-Wert [-]	1,3-Propandiol [g/L]	Ausbeute [g/g]
2-11	ARK50	5,21 ± 0,00	10,6 ± 0,1	0,50
2-8	AKR80a	5,17 ± 0,04	9,9 ± 0,1	0,51
2-8	AKR81	6,68 ± 0,01	0,1 ± 0,0	0,01
2-8	AKR82a	6,14	9,7	0,48
2-4	AKR91a	5,44	13,6	0,53
2-4	AKR91b	5,42 ± 0,01	13,5 ± 0,0	0,53
2-4	AKR92a	6,03 ± 0,02	11,9 ± 0,0	0,48
2-2	AKR102a	5,09 ± 0,03	8,0 ± 0,2	0,46
2-2	AKR102b	5,33 ± 0,24	8,5 ± 1,6	0,47
2-2	AKR103a	5,20 ± 0,01	10,2 ± 0,2	0,49

Neun der zehn Stämme bildeten 1,3-Propandiol im Bereich von 6,9 bis 13,6 g/L. Bezogen auf die Anzahl der Isolate auf Festmedium sind das insgesamt 64 %, dieser Anteil entspricht mehr als dem 2,3-fachen des Wertes, der im konventionellen Screening erreicht wurde (27 %; 9 von 33). Die beschriebene Kolonie-Evaluierung hat somit den Aufwand der Aufrei-

nigung erheblich verringert. Über die Güte der Reinkulturen als Produktionsstamm kann erst im Anschluss an das sekundäre Screening, die Stammevaluierung, eine Aussage getroffen werden.

4.4.2 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 3a

Während der Anreicherung des Screening 3a sind immer wieder Wachstumsprobleme aufgetreten. Aus diesem Grund, wurden die Anreicherungen 3a-18, 3a-23 und 3a-28, die in Flüssigkultur kein oder nur schlechtes Wachstum zeigten, direkt auf Festmedium aufgereinigt. Nur die Anreicherungskultur 3a-25 zeigte reproduzierbare Ergebnisse in Flüssigmedium. Eine konventionelle Aufreinigung ist hier sinnvoller als die im vorherigen Abschnitt beschriebene Evaluierung. Trotzdem wurde versucht, die beschriebene Kolonie-Evaluierung für diese Kultur anzuwenden, um das Verfahren zu testen und einen Vergleich mit den anderen Screening-Durchgängen zu ermöglichen.

Es wurden elf Kolonien als Inokulum für die Kolonie-Evaluierung in der DWP ausgewählt. Zusätzlich wurden die im Screening unter aeroben Bedingungen gewonnenen sechs Anreicherungskulturen (vgl. Kapitel 4.3.3) ebenfalls anaerob vereinzelt und 60 einzelne Kolonien unter anaeroben Bedingungen evaluiert.

Die Anreicherungskulturen wurden wie im Screening 2 zunächst vereinzelt und die einzelnen Kolonien vor der Aufreinigung im Schnelltestverfahren (Mikromaßstab, Einfachansatz) auf 1,3-Propandiol-Bildung getestet. Elf der insgesamt 71 getesteten Kolonie-Kulturen zeigten eine Absenkung des pH-Wertes über 0,5. In einem Medium mit verringertem Supplin-Gehalt (0,05 g/L Hefeextrakt und 5 mL/L Vitaminlösung DSMZ 141) und mit 12 g/L Rohglycerin der Charge 2 (geringer Glycerin-Gehalt durch fehlerhafte Herstellung des Mediums) bildeten die Kulturen 1,3-Propandiol im Bereich von 5,5 und 6,8 g/L. Neun der Kulturen stammten aus der anaeroben Anreicherung Nr. 3a-25. Zwei stammten aus der aeroben Anreicherung (Anreicherung Nr. 3b-1 und 3b-28)

Bereits bei der zweiten Inkubation der Kulturen, kam es jedoch zu massiven Wachstumsproblemen, weshalb die Evaluierung abgebrochen wurde. 1,3-Propandiol-bildende Kulturen mussten auf Festmedium vereinzelt und direkt aufgereinigt werden. Die Ursache der Wachstumshemmung wurde im Rahmen der Evaluierung der Reinkulturen aufgeklärt.

Von den so erhaltenen Reinkulturen ließen sich insgesamt zehn 1,3-Propandiol-bildende Reinkulturen in Flüssigkultur bringen. Die Herkunft ist in Tabelle 4.26 dargestellt.

Tabelle 4.26: Ergebnisse der Kultivierung der Reinkulturen des Screenings 3a nach 5 d Kultivierung (Hungate-Röhrchen, Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)

Anreicherung Nr.	Umweltprobe	Bezeichnung	pH-Wert [-]	1,3-Propandiol [g/L]	Ausbeute [g/g]
3a-1 / aerob	3	AKR197	5,39	6,3	0,43
3a-23 / anaerob	44	AKR186	5,76	5,5	0,42
3a-25 / anaerob		AKR244	5,67	5,9	0,47
3a-25 / anaerob		AKR246	5,41	6,7	0,46
3a-25 / anaerob		AKR247	5,47	5,5	0,43
3a-25 / anaerob		AKR249a	5,73	5,6	0,46
3a-25 / anaerob		AKR249b	4,95	4,8	0,37
3a-25 / anaerob		AKR250	5,76	5,4	0,46
3a-25 / anaerob		AKR253	5,48	6,4	0,39
3a-27 / anaerob		AKR263	6,46*	4,5*	0,44*

* Inkubationsdauer 1d

4.4.3 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 3b

Die Anreicherungskulturen des Screenings 3b (Kapitel 4.3.3) wurden bei Raumluft inkubiert, um aerotolerante Produktionsstämme zu gewinnen. Diese Kulturen wurden zum einen unter anaeroben Bedingungen zur Kolonie-Evaluierung eingesetzt (vgl. Kapitel 4.4.2).

Zum anderen wurden die 6 Anreicherungskulturen (vgl. Tabelle 4.19) nach der Vereinzelung auf Festmedium unter aeroben Bedingungen inkubiert. Dies sollte die Aufreinigung strikt anaerober Stämme ausschließen.

Es wurden 58 einzelne Kolonien von den Festmedien dieser aeroben Vereinzelung ausgewählt und als Inokulum für die Kolonie-Evaluierung verwendet. Um die Produktbildung der Kolonie-Kulturen zu überprüfen wurden diese grundsätzlich unter anaeroben Bedingungen (sauerstofffreies Medium, Stickstoffatmosphäre) inokuliert, da die Bildung von 1,3-Propandiol nur in anaeroben bzw. mikro-aeroben Milieu stattfindet (Chen et al., 2003). Die DWP mit den beimpften Medien wurde anschließend bei Raumluftatmosphäre inkubiert. Durch dieses Vorgehen sollte sichergestellt werden, dass von Anfang an anaerobe Bereiche in den Kultivierungsgefäßen vorlagen.

33 der 58 getesteten Kulturen zeigten bei Einsatz von 25 g/L Rohglycerin (unter verringerter Supplin-Zugabe) eine pH-Wert-Absenkung von über 0,5. Jedoch bildete keine dieser Kulturen signifikante Mengen an 1,3-Propandiol. Als Produkte wurden Ethanol, Bernsteinsäure, Essigsäure und Ameisensäure in unterschiedlichen Anteilen nachgewiesen.

Um die Produktionseigenschaften der Kolonie-Kulturen besser beurteilen zu können, wurden die aktiven Kulturen in optimiertem Evaluierungsmedium (vgl. Kapitel 4.2) mit 100 g/L Pharmaglycerin im Schnelltest-Verfahren (Einfachansatz, DWP) getestet. Die Ergebnisse der Kolonie-Evaluierung sind in Tabelle 4.27 dargestellt.

Tabelle 4.27: Ergebnisse der Kolonien-Evaluierung des Screening 3b nach 7 d Kultivierung (Inokulum von DWP, Mineralsalzmedium, 100 g/L Pharmaglycerin, 20 g/L CaCO₃, 32°C, aerob, ungeschüttelt) – gemessene Werte ohne rechnerische Korrektur

Anreicher- ung Nr.	Kolonie- Kultur	Umwelt- probe	pH-Wert [-]	Glycerin- Verbrauch [g/L]	Ethanol [g/L]	Bernstein- säure [g/L]	Ausbeute $\left[\frac{g_{\text{Bernsteinsäure}}}{g_{\text{Glycerin}}} \right]$
3b-28	135	45*	7,15	27,5	3,5	4,1	0,15
3b-17	154	26***	5,49	16,6	2,3	10,0	0,60
3b-17	155	26***	5,83	22,1	2,3	8,4	0,38
3b-17	156	26***	5,98	25,8	2,8	7,9	0,31
3b-11	163	4**	6,00	24,3	2,7	7,6	0,31
3b-11	164	4**	5,97	22,0	2,3	8,1	0,37
3b-11	165	4**	6,07	31,0	2,1	7,3	0,23
3b-11	166	4**	5,64	25,0	2,1	9,6	0,38
3b-1	173	3**	5,60	22,4	2,3	9,3	0,42
3b-1	174	3**	5,95	21,6	2,1	7,9	0,37
3b-1	175	3**	6,08	28,7	2,6	7,4	0,26
3b-1	176	3**	5,60	26,9	2,2	9,5	0,35
3b-1	177	3**	5,59	18,7	1,9	10,2	0,55
3b-1	178	3**	5,61	22,9	2,0	8,8	0,38
3b-1	179	3**	5,62	24,9	2,2	9,6	0,38
Anreicher- ung Nr.	Isolat	Umwelt- probe	pH-Wert [-]	Glycerin- Verbrauch [g/L]	Ethanol [g/L]	Bernstein- säure [g/L]	Ausbeute $\left[\frac{g_{\text{Ethanol}}}{g_{\text{Glycerin}}} \right]$
3b-28	125	45*	7,81	37,6	4,6	3,8	0,12
3b-28	126	45*	7,75	40,4	5,2	4,0	0,13
3b-28	128	45*	8,41	25,5	4,2	1,2	0,16
3b-28	129	45*	7,74	37,4	5,4	4,2	0,14
3b-28	134	45*	8,47	35,0	4,8	2,6	0,14
3b-28	137	45*	7,48	42,3	10,0	1,4	0,24
3b-28	138	45*	8,03	30,9	4,3	2,4	0,14
3b-28	143	45*	8,27	27,8	4,1	1,8	0,15
3b-28	144	45*	8,31	27,3	4,2	2,1	0,15
3b-28	145	45*	8,12	29,1	4,5	2,5	0,16
3b-22	146	43*	7,89	26,4	3,9	1,9	0,15
3b-22	148	43*	8,34	27,6	3,9	1,8	0,14
3b-17	157	26***	8,33	24,5	3,7	0,7	0,15
3b-11	168	4**	7,77	25,9	3,5	1,7	0,13
3b-11	170	4**	7,95	32,0	4,0	3,2	0,13
3b-11	171	4**	8,05	24,5	3,8	1,9	0,15
3b-1	180	3**	8,11	29,5	3,9	3,1	0,13
3b-1	182	3**	8,24	27,3	3,7	2,5	0,14

* Kompost; ** Erde; ***Tiermist;

Nur in der Kolonie-Kultur 137 war 1,3-Propandiol als Nebenprodukt nachzuweisen, die Konzentration war mit 3 g/L jedoch gering.

Alle getesteten Isolate haben entweder Bernsteinsäure oder Ethanol als Hauptprodukt gebildet. Zusätzlich wurden als Nebenprodukte Spuren von Essigsäure, Milchsäure und Ameisensäure detektiert.

Im ersten Abschnitt der Tabelle sind 15 Kulturen zusammengefasst, die als Hauptprodukt Bernsteinsäure bildeten. Die 18 Kulturen im zweiten Abschnitt bildeten das Hauptprodukt Ethanol. Wie bereits z. B. für Essigsäure untersucht wurde, kann die Konzentration organischer Stoffwechselprodukte bei Inkubation in DWP teilweise durch Verdunstungseffekte beeinflusst sein (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Ethanol wurde bisher nicht auf seine Verdunstung während der Kultivierung untersucht, hat jedoch sowohl einen geringeren Siedepunkt als auch einen höheren Dampfdruck als Essigsäure (78,3°C bzw. 59 hPa bei 20°C, Merck Herstellerangaben). Die für Ethanol bestimmten Konzentrationen und Ausbeuten sind somit lediglich qualitativ zu bewerten, da es zu Verdunstungs- bzw. Anreicherungseffekten kommen kann. Bernsteinsäure liegt im betrachteten Temperaturbereich als Feststoff bzw. als Salz vor (Schmelzpunkt 185-190°C, Siedepunkt 235°C, Merck Herstellerangaben), eine Verdunstung ist damit wenig wahrscheinlich. Die Konzentrationszunahme durch die Verdunstung des Wassers betrug im Mittel ca. 3 %, dies wurde jedoch auf Grund der unterschiedlichen Verdunstung der Produkte in den in Tabelle 4.27 dargestellten Werten nicht korrigiert.

Bei der Bildung von vorwiegend Bernsteinsäure sind die pH-Werte sehr niedrig. Bernsteinsäure ist eine Dicarbonsäure mit den pKs-Werten 4,17 und 5,64. Beim pH-Wert der Kultivierung wird vorwiegend das Anion der Säure vorliegen, so dass die pH-Pufferkapazität des Mediums verbraucht wird und die Endkonzentration hierdurch begrenzt ist (vgl. Kapitel 4.2.1). Die erreichten Konzentrationen an Bernsteinsäure liegen zwischen 4,1 und 10,2 g/L. Die Ausbeuten sind unter den gegebenen Bedingungen relativ niedrig, nur die Isolate 154 und 177 bilden hier die Ausnahme (0,60 bzw. 0,55 g/g).

Die Konzentrationen die für Kulturen mit Ethanol als Hauptprodukt ermittelt wurden, liegen im Bereich von 3,5 bis 10,0 g/L. Die Ausbeuten sind ebenfalls niedrig, was zum Teil durch oben beschriebene Verdunstungseffekte erklärt werden kann. Die pH-Werte dieser Kulturen sind hoch, da das Hauptprodukt keine Säuregruppe aufweist.

Die veränderten Sauerstoffbedingungen während Anreicherung, Vereinzelung und Kolonie-Evaluierung haben somit zu Produktionsstämmen mit einem komplett anderen Produktspektrum geführt. Bei Vereinzelung und Kolonie-Evaluierung unter anaeroben Bedingungen (vgl. Kapitel 4.4.2) wurde ebenfalls nur ein 1,3-Propandiol-Produzent isoliert. Die Anreicherungsmethode für Sauerstoff-tolerante 1,3-Propandiol-Produzenten war nicht erfolgreich. Die Abwesenheit von Sauerstoff hat sich als notwendiges Kriterium für die Anreicherung bzw. Isolierung von 1,3-Propandiol-produzierenden Bakterienstämmen erwiesen. Es wird ebenfalls deutlich, dass eine Variation der Screening-Parameter für die Anreicherung anderer

Stoffwechselendprodukte aus Glycerin entscheidend sein kann. Somit kann die hier durchgeführte Screening-Methode flexibel angewendet werden.

Die Produzenten von Bernsteinsäure aus Tabelle 4.27 sind jedoch ebenfalls interessant. Bernsteinsäure wird als eine der wichtigsten Plattformchemikalien aus regenerativen Rohstoffen angesehen (Bechthold et al., 2008). Ihre Herstellung aus dem günstigen Rohstoff Rohglycerin ist attraktiv.

Die meisten natürlichen Produzenten von Bernsteinsäure, die in der Literatur beschrieben sind, wurden aus dem Pansen von Wiederkäuern isoliert. Hier sind die Bedingungen für die Bildung von Bernsteinsäure, unter anaeroben Bedingungen in der Gegenwart von CO₂, ideal. *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* und *Bacteroides fragilis* wurden aus dem Pansen isoliert. Auf Grund der Herkunft aus einem extrem nährstoffreichen Habitat, benötigen die meisten dieser Stämme komplexe Medienzusätze wie Hefeextrakt (Beauprez et al., 2010).

Die in der Literatur beschriebenen Stämme *A. succinogenes* und *M. succiniciproducens* sind fakultativ anaerob, *A. succiniciproducens* ist strikt anaerob (Beauprez et al., 2010). Diese produzieren neben Bernsteinsäure eine Mischung anderer flüchtiger organischer Säuren und benötigen Kohlendioxid und Kohlehydrate zum Wachstum. Als Kohlendioxidquellen können auch feste Carbonatsalze, wie Magnesiumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat oder das hier verwendete Calciumcarbonat dienen (Song et al., 2007).

Um das Potenzial der Isolate für die Bernsteinsäure-Produktion genauer beurteilen zu können, wurden diejenigen, die mehr als 5 g/L Bernsteinsäure gebildet hatten, im beschriebenen Schnelltestverfahren (DWP, Einfachansatz) evaluiert. Die starke Absenkung des pH-Wertes durch die Dicarbonsäure sollte durch eine Verdopplung des eingesetzten Calciumcarbonates auf 40 g/L ausgeglichen werden. Die Umsetzung von 40 g/L Pharmaglycerin wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen untersucht. Um den Einfluss der Umgebungsumgebung zu beurteilen, wurden zwei Ansätze unter anaeroben Bedingungen beimpft. Ein Ansatz wurde anschließend bei Raumluft inkubiert, der andere wurde in einen Anaerobier-Topf überführt. Dieser enthielt zunächst Raumluft. Durch das anaerobisierende Reagenz (vgl. Kapitel 3.2.1) wurde der anwesende Sauerstoff in Kohlendioxid umgewandelt, so dass das gebildete Gasgemisch annähernd Raumluft Zusammensetzung, jedoch ohne Sauerstoff, entsprach. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

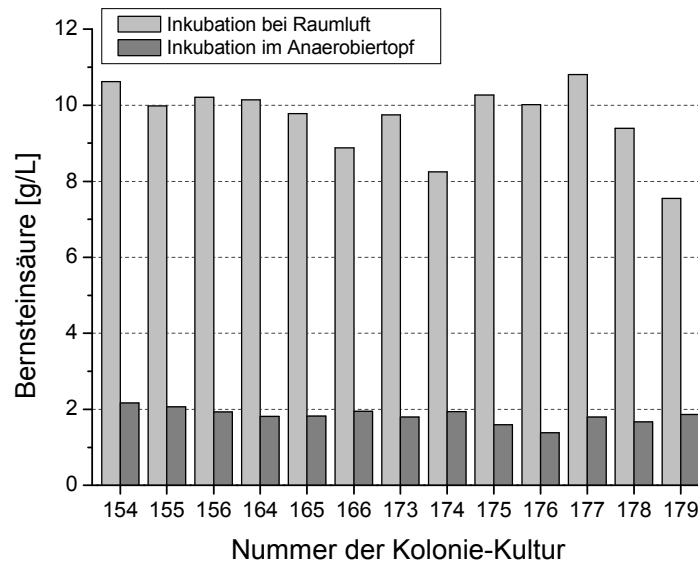


Abbildung 4.18: Beurteilung Sauerstoff-Einflusses – Bernsteinsäure-Bildung nach 5 d Kultivierung bei Raumluft bzw. im Anaerobier-Topf (Mineralsalzmedium mit 40 g/L Pharmaglycerin, 32°C, ungeschüttelt) – rechnerisch korrigierte Werte

Die Inkubation bei Raumluftatmosphäre erbrachte erneut Bildung von Bernsteinsäure. Die Konzentrationen lagen im Bereich 7,5 und 10,8 g/L. Die Werte waren jedoch nicht wesentlich höher als zuvor, trotz stark erhöhter pH-Pufferung. Die pH-Werte lagen zwischen 5,5 und 5,9. Die höchste Ausbeute mit 0,70 g/g erreichte die Kolonie-Kultur 154, gefolgt von 173 (0,62g/g), 156 (0,59 g/g), 155 (0,58 g/g) und 164 (0,55 g/g).

Die anaerobe Inkubation führte zu stark verringerter Produktbildung im Bereich von 1,7 bis 2,1 g/L (bei Glycerin-Verbrauch zwischen 6 und 7 g/L). Nebenprodukte lagen nicht in signifikanter Menge vor. Die Anwesenheit von zumindest geringen Mengen Sauerstoff ist somit erforderlich für die Bildung von Bernsteinsäure durch die vorliegenden Mikroorganismen.

Die Kolonie-Kulturen wurden gleichzeitig auf ihre Produktbildung aus 40 g/L Pharmaglycerin bei Vorlage von 10, 20, 30 und 40 g/L Bernsteinsäure im Schnelltestverfahren getestet. Alle untersuchten Kolonie-Kulturen zeigten Glycerin-Verbrauch und Bernsteinsäurebildung bis zu einer Vorlage von 40 g/L Bernsteinsäure. Die Kulturen 173, 174 und 177 zeigten die besten Toleranzeigenschaften. Die Ergebnisse dieser Kulturen sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

Die drei untersuchten Kulturen zeigen ähnliches Verhalten. Bereits bei einer Vorlage von 10 g/L Bernsteinsäure ist ein deutlicher Einbruch der Produktion zu verzeichnen (Produktbildung im Bereich 5,4 – 6,9 g/L). Bei höheren Konzentrationen bilden 174 und 177 noch zwischen 2,4 und 3,6 g/L Bernsteinsäure, die Kultur 173 liegt mit 3,7 bis 4,7 geringfügig darüber. Der Glycerin-Verbrauch der Kulturen ging bei 40 g/L Bernsteinsäure-Vorlage deutlich zurück. Grundsätzlich sind die Kulturen zu Wachstum und Produktbildung bei bis zu 40 g/L Bernsteinsäure fähig. Die verringerte Produktion könnte durch vermehrte Bildung anderer Neben-

produkte bei hohen Bernsteinsäure Konzentration erklärt werden, dies wurde jedoch nicht bzw. kaum beobachtet. Es ist auch möglich, dass Bernsteinsäure zwar gebildet wurde, jedoch als schwerlösliches Calciumsuccinat ausgefallen ist.

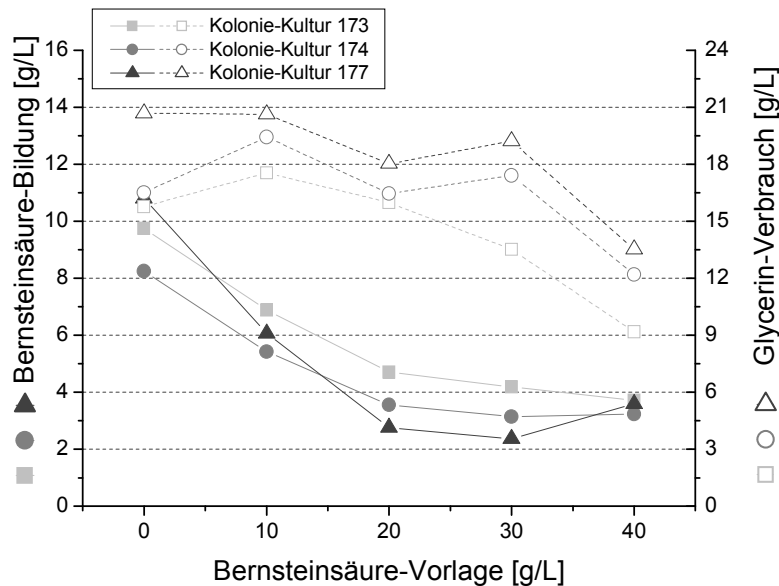


Abbildung 4.19: Beurteilung der Produkt-Toleranz der Kolonie-Kulturen des Screenings 3b – Bernsteinsäure-Bildung bzw. Glycerin-Verbrauch nach 5 d Kultivierung (Mineralsalzmedium mit 40 g/L Pharmaglycerin und Vorlage von 10, 20, 30 und 40 g/L Bernsteinsäure, Raumluft, 32° C, ungeschüttelt) – rechnerisch korrigierte Werte

Die untersuchten Mikroorganismen unterscheiden sich von den in der Literatur beschriebenen. Sie wurden mit sehr geringer Supplin-Zugabe angereichert, zudem nutzen sie das Substrat Glycerin. Ein weiterer Unterschied zu den beschriebenen Stämmen ist der Bedarf an Sauerstoff für die Umsetzung. Eine weitere Untersuchung ist somit wünschenswert, für das Ziel dieser Arbeit jedoch nicht relevant.

4.4.4 Kolonie-Evaluierung – Screening-Durchgang 4

Die Anreicherungskulturen aus dem Screening-Verfahren 4 (vgl. Kapitel 4.3.4, Tabelle 4.23) wurden vereinzelt und inkubiert. Je 40 Kolonien wurden je eingesetzter Umweltprobe (Sediment / Gewässer bzw. Kompost) ausgewählt und zur Inokulation des flüssigen Screening-Mediums (vgl. Tabelle 4.21) in einer DWP verwendet. Da in diesem Screening Durchgang schnell wachsende Kulturen selektiert werden sollten, wurden die Kulturen bereits nach 2 d anaerober Inkubation auf ihre pH-Wert-Absenkung getestet. Insgesamt zeigten 32 der 80 (40 %) Kolonie-Kulturen eine pH-Wert-Absenkung über 0,5, jeweils 16 Kulturen der Sediment-Anreicherung und 16 der Kompost-Anreicherung. Es wurden alle Kulturen zur Evaluierung der Produktionseigenschaften im Schnelltest-Verfahren (DWP, Einfachansatz) eingesetzt. Die Bewertung der Stämme ist der Tabelle 4.28 zu entnehmen.

Tabelle 4.28: Ergebnisse der Kolonien-Evaluierung des Screenings 4 – Medien PG 100|0+CO₃, RG 100|0+CO₃, PG 60|80+CO₃ (Inokulum von DWP, 5 d anaerobe Inkubation in DWP, 32 °C, 350 upm) – Werte rechnerisch korrigiert

Proben-Gruppe	Kolonie	1,3-PD-Produktion		Rohglycerin-Verwertung			1,3-PD-Toleranz	
		PG 100 0+CO ₃	Bewer- tung ^a	RG100 0+CO ₃	Bewer- tung ^a	RG- Toleranz [%]	PG 60 80+CO ₃	Bewer- tung ^b
		c _{1,3-PD} [g/L]		c _{1,3-PD} [g/L]			c _{1,3-PD} [g/L]	
Sediment / Gewässer	265	46,7	+++	45,1	+++	97	<80,0	-.
	266	42,6	+++	45,3	+++	106	101,6	+++
	267	42,5	+++	46,2	+++	109	102,7	+++
	278	46,5	+++	41,3	+++	89	96,7	++
	279	44,4	+++	39,6	+++	89	97,5	++
	280	43,8	+++	41,3	+++	94	98,4	++
	282	40,1	+++	42,6	+++	106	95,6	++
	283	9,1	-	47,8	+++	523	87,3	-
	284	12,2	+	47,0	+++	386	81,4	-
	286	36,2	+++	46,0	+++	127	101,9	+++
	287	42,3	+++	39,5	+++	93	95,0	++
	288	41,3	+++	41,7	+++	101	93,9	+
	291	20,2	++	47,0	+++	233	84,0	-
	298	38,0	+++	38,7	+++	102	97,7	++
	302	42,0	+++	41,0	+++	98	94,9	+
	303	10,0	-	48,4	+++	484	84,3	-
Kompost	313	27,9	++	39,6	+++	142	92,3	+
	314	27,0	++	35,8	+++	133	97,2	++
	315	27,9	++	34,4	+++	123	96,0	++
	318	41,3	+++	35,7	+++	87	95,0	++
	323	34,3	+++	39,8	+++	116	96,9	++
	325	41,6	+++	41,1	+++	99	96,7	++
	327	40,8	+++	41,9	+++	103	92,6	+
	332	31,5	+++	39,2	+++	124	93,0	+
	336	42,1	+++	40,9	+++	97	95,9	++
	337	35,3	+++	42,0	+++	119	94,2	+
	338	40,9	+++	41,0	+++	100	94,7	+
	339	28,8	++	41,1	+++	143	96,1	++
	340	41,9	+++	38,6	+++	92	93,7	+
	341	43,6	+++	40,0	+++	92	96,0	++
	342	42,8	+++	40,6	+++	95	96,6	++
	344	40,2	+++	41,2	+++	103	95,2	++

-: schlecht; +: gut; ++: sehr gut; +++: hervorragend;

^a 1,3-PD-Endkonzentration: -: <10 g L⁻¹; +: 10-20 g L⁻¹; ++: 20-30 g L⁻¹; +++: >30 g L⁻¹;

^b 1,3-PD-Endkonzentration: -: < 90 g/L; + ≥ 90 g/L; ++ ≥ 95 g/L; +++ ≥ 100 g/L

Wie in den vorherigen Kolonie-Evaluierungen wurden die Produktbildung aus Pharma- und Rohglycerin getestet, zusätzlich wurde die Rohglycerin-Toleranz nach Gleichung 4.1 berechnet. Die 1,3-Propandiol-Toleranz wurde ebenfalls eingeschätzt und als Hauptentscheidungskriterium für die Auswahl zu Aufreinigung herangezogen. Hierfür wurde das verbesserte pH-Puffersystem eingesetzt, um Hemmeffekte besser beurteilen zu können.

Alle Kolonie-Kulturen zeigten Wachstum und eine 1,3-Propandiol-Bildung von über 30 g/L bei Einsatz von 100 g/L Rohglycerin, acht der getesteten Kolonie-Kulturen (25 %) bildeten über 45 g/L Produkt, wobei diese Kulturen alle aus Gewässersediment-Anreicherungen stammten. Diese Ergebnisse wurden mit dem einfachen in Kapitel 4.2.2.2 beschriebenen System erreicht, also unter nicht optimierten Bedingungen ohne pH-Regelung im Batch-Prozess. Dennoch liegen sie nur wenig unterhalb vieler in der Literatur beschriebener Ergebnisse, die im optimierten Fed-Batch mit Rohglycerin aus der Biodiesel-Industrie erreicht wurden. So haben z. B. (Mu et al., 2006) bei Einsatz von *K. pneumoniae* eine Endkonzentration von 51,3 g/L erreicht. Für *C. butyricum* liegen die Ergebnisse von Rehman et al. (2008) und Otte et al. (2009) mit 45,0 g/L bzw. 53,7 g/L im vergleichbaren Bereich.

Die Produktbildung bei Einsatz von Pharmaglycerin war hingegen bei mehreren Kolonie-Kulturen (z. B. Nr. 283, 284 und 303) deutlich gehemmt, so dass diese Rohglycerin-Toleranzen von z. T. weit über 100 % erreichten. Dies lässt vermuten, dass im Rohglycerin Substanzen vorliegen, die die Produktbildung der isolierten Spezies fördern. Betrachtet man die Rohglycerin-Toleranz, so zeigen alle Kolonie-Kulturen eine Toleranz über 80 %, 20 der Kulturen zeigen eine Toleranz von über 100 %, wurden also in ihrer Produktbildung durch Rohglycerin gefördert. Diese Kolonie-Kulturen wurden bevorzugt für die Vereinzelung ausgewählt.

In dieser Kolonie-Evaluierung war die optimierte pH-Pufferung mit Calciumcarbonat eingesetzt worden, so dass größere Unterschiede in der Produktbildung der Kolonie-Kulturen möglich waren. Neben einer Aussage, ob Produktbildung bei der vorgelegten 1,3-Propandiol-Konzentration möglich war, kann auch eine Unterscheidung der untersuchten Kolonie-Kulturen hinsichtlich der erreichbaren 1,3-Propandiol-Endkonzentration getroffen werden. Zur Einschätzung der 1,3-Propandiol-Toleranz der Kolonie-Kulturen wurden daher die Produktendkonzentrationen herangezogen.

Diese zeigen für die Sediment-Anreicherung deutlich größere Unterschiede, die Produktkonzentrationen liegen zwischen 80 und 103 g/L. Die Kolonie-Kulturen 266, 282, 286 und 298 wurden ausgewählt, da sie sehr gute bis hervorragende 1,3-Propandiol-Toleranz und eine Rohglycerin-Toleranz von über 100 % zeigten. Da Kultur 266 und 267 von demselben Festmedium isoliert wurden und nahezu identische Ergebnisse erzielt haben, handelt es sich höchstwahrscheinlich um dieselbe Spezies. Aus diesem Grund wurde ausschließlich Kultur 266 weiter untersucht.

Die Kulturen aus der Kompost-Anreicherung zeigen niedrigere 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen. Jedoch erreichten alle Kulturen bei Vorlage von 80 g/L noch 1,3-Propandiol-Konzentrationen von über 90 g/L, wodurch sie als gut bis sehr gut eingestuft wurden. Aus dieser Anreicherung wurden die Kulturen 323 und 339, die zusätzlich eine Rohglycerin-Toleranz von über 100 % aufwiesen, für die Aufreinigung ausgewählt.

Die Kulturen, die aus der Anreicherungskultur mit Gewässersediment stammten, zeigten z. T. bessere Ergebnisse als bei der Anreicherung aus Kompost. Sie bildeten sehr hohe 1,3-Propandiol-Konzentrationen mit Rohglycerin bzw. erreichten 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen von über 100 g/L. In Gewässersedimenten liegen hohe Bakteriendichte, vor (Uhlmann und Horn, 2006). Zudem findet, vor allem in geschichteten Gewässern in der Stagnationsphase, anaerober Abbau der organischen Substanzen und der Abbau von Lipiden zu Glycerin und langkettigen Fettsäuren statt (Scheer, 2010). Die Anwesenheit der 1,3-Propandiol-Produzenten in den Kompostproben kann durch das Vorliegen von Pflanzenölen und deren Abbauprodukten in Haushaltskompost erklärt werden.

Sechs Kolonie-Kulturen wurden für die Herstellung von Reinkulturen ausgewählt. Neun Reinkulturen konnten auf Festmedium kultiviert werden, wobei für acht davon Wachstum und 1,3-Propandiol-Bildung in Flüssigkultur möglich war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.29 zusammengefasst.

Tabelle 4.29: Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 25 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)

Proben-Gruppe	Bezeichnung	pH-Wert [-]	1,3-Propandiol [g/L]	Ausbeute [g/g]
Sediment / Gewässer	AKR266	5,77	12,0	0,48
	AKR282	5,43	8,2	0,38
	AKR286	5,69	11,5	0,47
	AKR298a	5,56	7,6	0,35
Kompost	AKR323a	5,65	6,3	0,33
	AKR323b	5,41	11,3	0,45
	AKR323c	5,67	6,3	0,32
	AKR339	5,54	6,5	0,33

Die Reinkulturen bildeten zwischen 6,3 und 12 g/L 1,3-Propandiol. Erneut konnte der Aufwand der Aufreinigung erheblich reduziert werden, statt 80 Kolonien wurden lediglich 6, etwa 8 %, vereinzelt.

4.4.5 Zusammenfassung – Kolonie-Evaluierung

Die Kolonie-Evaluierung wurde entwickelt, um die Aufreinigung zur Reinkultur selektiver zu gestalten. Nach der Vereinzelnung der Anreicherungskultur werden die einzeln stehenden Kolonien unmittelbar in Flüssigkultur übertragen. Der Einsatz von DWP ermöglicht die gleichzeitige Isolierung sehr vieler Kolonien. Da eine Unterscheidung zwischen 1,3-Propandiol-produzierenden und Begleitorganismen auf Festmedium schwierig ist, wird so die Wahrscheinlichkeit erhöht, die gewünschten 1,3-Propandiol-Produzenten zu isolieren. Durch HPLC-Analyse der Wells, die metabolischer Aktivität in Form einer Absenkung des pH-Wertes zeigen, können 1,3-Propandiol-Produzenten schnell identifiziert werden. Die in

der DWP vorliegenden Kolonie-Kulturen können in einer Schnell-Evaluierung (Einfachansatz) auf ihre Produktionseigenschaften, 1,3-Propandiol-Toleranz und Rohglycerin-Verwertung, getestet werden. So wird die aufwändige Aufreinigung der in der Anreicherungskultur anwesenden Begleitorganismen minimiert. Das Verfahren ist zudem automatisierbar. Bei Einsatz von lediglich einer DWP konnten so 80 Kolonien gleichzeitig isoliert werden.

Die Wahl des verwendeten Flüssigmediums, und damit dessen Selektivität, beeinflusste den Aufwand der Kolonie-Evaluierung erheblich. So wurde in Screening 2 ein Standardmedium mit 50 g/L Rohglycerin verwendet. Es wurden 18 1,3-Propandiol-produzierende Kolonie-Kulturen gewonnen. Die Kolonie-Evaluierung erbrachte, dass lediglich 7 davon bei einer Produkt-Vorlage von 70 g/L 1,3-Propandiol hinzubildeten. Im Screening 4 wurde zur Isolierung der Kolonien das Screening-Medium verwendet, welches bereits 60 g/L 1,3-Propandiol enthielt. 32 Kolonie-Kulturen zeigten Wachstum. Alle diese Kulturen bildeten 1,3-Propandiol in der anschließenden Kolonie-Evaluierung in Anwesenheit von 80 g/L Produkt hinzu.

Die Kolonie-Evaluierung in Screening 2 und 4 ermöglichte eine fundierte Auswahl der Kulturen, die zur Reinkultur aufgereinigt werden sollten. Auswahlkriterien waren hier vor allem 1,3-Propandiol-Toleranz und die Nutzung hoher Konzentrationen an Rohglycerin (100 g/L).

Zu Problemen kam es in Screening 3a, da hier das Wachstum in der Mehrzahl der Kolonie-Kulturen gehemmt war, wenn diese in neues Medium übertragen wurden. Diese Kulturen mussten ohne vorherige Kolonie-Evaluierung aufgereinigt werden.

Die Kolonie-Evaluierung des Screening 3b, welche bei Raumluftatmosphäre durchgeführt wurde, ergab keine 1,3-Propandiol-Produzenten. Die veränderten Sauerstoffbedingungen führten zu Kolonie-Kulturen mit einem sehr unterschiedlichen Produktspektrum. Hauptprodukte waren Ethanol und Bernsteinsäure.

4.5 Evaluierung der Reinkulturen

In einem sekundären Screening, einer detaillierten Evaluierung, werden die 1,3-Propandiol-produzierenden Reinkulturen auf ihre Produktionseigenschaften getestet. Im Anschluss kann so eine Auswahl getroffen und die Anzahl der Stämme minimiert werden, die im Fed-Batch-Verfahren genauer untersucht werden müssen.

Die Evaluierung der Reinkulturen des konventionellen Screening-Verfahrens war durch den bisher verwendeten Maßstab der Kultivierung und die Kultivierungsbedingungen, besonders die geringe pH-Pufferung, nur begrenzt aussagefähig (vgl. Kapitel 4.1.3). In Kapitel 4.2 wurde eine Evaluierungsmethode im Mikromaßstab entwickelt, bei der diese Probleme gelöst wurden. Diese Methode wurde nun zur Beurteilung der Reinkulturen eingesetzt.

4.5.1 Reinkulturen des Screening-Durchgangs 2

Die Stamm-Anforderungen, die in Screening-Durchgang 2 verwirklicht werden sollten, waren neben dem Ausschluss pathogener *Enterobacteriaceae* im Wesentlichen eine hohe Produkt-Toleranz und Rohglycerin-Verwertung bzw. –Toleranz (vgl. Kapitel 4.3.1, Tabelle 4.12).

Für die Evaluierung im Mikromaßstab wurden die optimierten Kultivierungsbedingungen für eine Hochdurchsatz-Evaluierung angewendet (Maßstab, Medienzusammensetzung, pH-Pufferung, Inkubationsdauer; vgl. Kapitel 4.2). So kann eine hohe Anzahl an Parametern in kurzer Zeit evaluiert werden. Im Zuge der Evaluierung wurde die Produktbildung getestet, die Produktivität der Umsetzung wurde nicht untersucht. Da im Mikromaßstab die Gefahr der Kreuzkontamination erhöht ist und die Verdunstung eine signifikante Rolle spielt (Duetz, 2007), wurden alle Versuche im Vierfachansatz durchgeführt, um eine hohe statistische Sicherheit zu gewährleisten.

Eine der wichtigsten Eigenschaften für einen Produktionsstamm ist die Produkt-Toleranz als Voraussetzung für hohe Produktendkonzentrationen. Daher wurde die 1,3-Propandiol-Toleranz als Hauptkriterium in der Evaluierung der Reinkulturen verwendet. Die Stämme AKR 50, 80a, 82a, 91a, 91b, 92a, 102a, 102b und 103a wurden auf ihre Fähigkeit getestet in Gegenwart hoher 1,3-Propandiol-Konzentrationen zu wachsen und 1,3-Propandiol zu bilden. Es wurde 1,3-Propandiol in fünf Konzentrationsstufen zwischen 30 und 77 g/L vorgelegt, die Substratkonzentration betrug 60 g/L (1 g/L Hefeextrakt bei Glycerin-Konzentration unter 100 g/L). Die 1,3-Propandiol-Produktion der Reinkulturen ist in Abbildung 4.20 dargestellt.

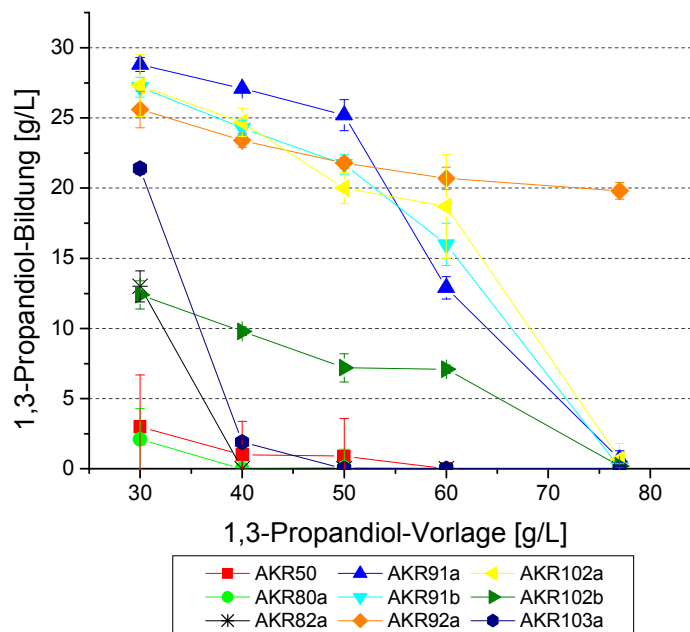


Abbildung 4.20: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR50, 80a, 82a, 91a, 91b, 92a, 102a, 102b und 103a – 1,3-Propandiol-Zunahme nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 30, 40, 50, 60 und 77 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Alle untersuchten Isolate zeigten bei einer 1,3-Propandiol-Vorlage von 30 g/L Produktbildung. Da die Isolate aus Anreicherungsmedien stammen, die mindestens 40 g/L 1,3-Propandiol beinhalten, ist dies erwartet worden. Im Falle von AKR50 und AKR80a war der Zuwachs jedoch sehr gering. Bei 1,3-Propandiol-Vorlage von 40 g/L bildeten diese Isolate ebenso wie AKR82a und AKR103a nur noch geringfügige Mengen des Produktes. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass die eingesetzte Menge an Glycerin mit 60 g/L hier deutlich über der in der Anreicherung verwendeten Menge von 15 g/L liegt und es zu einer zusätzlichen Hemmung durch das Substrat kommt (Colin et al., 2000).

Die Isolate AKR91b und 102a zeigten eine gute 1,3-Propandiol-Toleranz. Sie bildeten 1,3-Propandiol bis zu einer Produkt-Vorlage von 60 g/L. AKR91a und 102b bildeten ebenfalls bei 60 g/L 1,3-Propandiol-Vorlage noch Produkt. Für AKR 91a war hier bereits eine deutlich geringere Produktbildung zu verzeichnen, nur ca. 50 % der Menge, die bei 50 g/L 1,3-Propandiol-Vorlage entstand. Der Stamm AKR102b zeigte in allen Ansätzen eine sehr niedrige 1,3-Propandiol-Bildung (12,4 bis 7,1 g/L) im Vergleich mit den anderen toleranten Isolaten, bei denen die Zunahme im Bereich von 20 bis 30 g/L 1,3-Propandiol lag.

AKR92a hatte die höchste 1,3-Propandiol-Toleranz. Der Stamm bildete 1,3-Propandiol bei allen 1,3-Propandiol-Vorlagen, auch bei der höchsten Vorlage von 77 g/L zeigte er kaum Hemmung der Produktbildung (ca. 23 % im Vergleich zu 30 g/L Vorlage).

In der Literatur beschriebene Hemmkonzentrationen für gute 1,3-Propandiol-Produzenten liegen zwischen 50 und 70 g/L. Zeng et al. (1994) haben für *C. butyricum* und *K. pneumoniae* aus experimentellen Daten (Chemostat bzw. Auxostat) eine 1,3-Propandiol-Hemmkonzentration von 71,4 g/L berechnet. Experimentell haben Cheng et al. (2005) für *K. pneumoniae* M5a1 in pH-geregelten Batch-Versuchen eine komplette Hemmung durch 69 g/L 1,3-Propandiol-Vorlage (bei 30 g/L Glycerin-Startkonzentration) ermittelt. Eine neuere Studie über *C. diolis* DSMZ 15410 untersucht den Wildtyp des Stammes, welcher bereits bei einer 1,3-Propandiol-Konzentration von 50 g/L komplett gehemmt ist (Otte et al., 2009).

Colin et al. (2000) haben pH-geregelte Batch-Untersuchungen mit *C. butyricum* CNCM 1211 durchgeführt, die den hier beschriebenen Untersuchungen ähnelten. Bei einer Startkonzentration von 20 g/L Glycerin erfolgte bis zu einer Vorlage von 60 g/L 1,3-Propandiol Produktbildung. Das Substrat wurde in allen Versuchen komplett umgesetzt und die 1,3-Propandiol-Vorlage hatte somit keinen negativen Einfluss auf die Produktbildung, wohl aber auf die Wachstumsrate. Die Ergebnisse für AKR91a, AKR91b, AKR102a und AKR102b stimmen gut mit diesen Untersuchungen überein. Die Isolate waren jedoch nicht Substratlimitiert, so dass sich mit zunehmender Produkt-Vorlage eine Verringerung der 1,3-Propandiol-Bildung zeigte. Der Stamm AKR92a übertrifft die in der Literatur beschriebenen Hemmkonzentrationen.

Die Stämme AKR91b, 92a und 102a werden auf Grund ihrer guten bis sehr guten 1,3-Propandiol-Toleranz in Abbildung 4.21 genauer dargestellt.

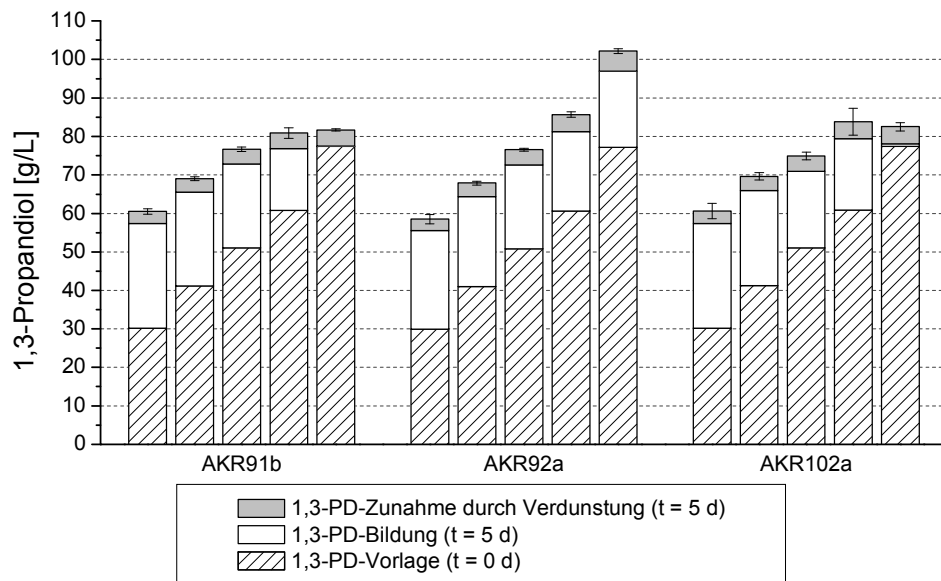


Abbildung 4.21: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR91b, AKR92a, AKR102a – 1,3-Propandiol-Vorlage, -Zunahme durch Bildung und -Zunahme durch Verdunstung nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 30, 40, 50, 60 und 77 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C, 350 upm)

AKR92a produzierte 1,3-Propandiol im Bereich von 26 bis 20 g/L bis zur höchsten eingesetzten 1,3-Propandiol-Vorlage von 77 g/L. Die Konzentration für eine komplette Hemmung der 1,3-Propandiol-Produktion konnte nicht bestimmt werden. Die höchste gemessene 1,3-Propandiol-Endkonzentration wurde mit 77 g/L Vorlage erreicht und betrug 102,2 g/L 1,3-Propandiol. AKR91b produzierte zwischen 27 und 16 g/L 1,3-Propandiol bis zu einer Produktvorlage von 60 g/L und erreichte eine 1,3-Propandiol-Konzentration von 81 g/L. Bei höheren 1,3-Propandiol-Konzentrationen konnte keine Produktbildung mehr nachgewiesen werden. AKR102a bildete bis zu 60 g/L Vorlage 1,3-Propandiol im Bereich von 27 bis 19 g/L. Die höchste Endkonzentration betrug 84 g/L 1,3-Propandiol bei einer Vorlage von 60 g/L.

Colin et al. (2000) beschreibt das Phänomen, dass die maximal erreichte 1,3-Propandiol im Batch-Versuch oberhalb der Hemmkonzentration liegt. Bei einer Vorlage von 50 g/L 1,3-Propandiol und 70 g/L Glycerin erreicht der Stamm *C. butyricum* CNCM 1211 83,7 g/L 1,3-Propandiol. Dieser Unterschied zwischen hemmender Anfangskonzentration und tolerierter Endkonzentration konnte bei den Stämmen AKR 91b und AKR102a ebenfalls beobachtet werden. Colin et al. (2000) schließen daraus, dass die hemmende Wirkung des 1,3-Propandiols auf das Wachstum größer ist als auf die Produktbildung.

Die hier erzielten Hemmwerte sind abhängig von den Versuchsbedingungen, so handelt es sich um Batch-Versuche mit relativ hohen Edukt-Konzentrationen, der pH-Wert ist nicht ge-

regelt. Zudem haben Konzentrationen und Art der Nebenprodukte erheblichen Einfluss auf die erreichbaren Endkonzentration (Zeng et al., 1994), so dass eine Aussage über die im Fed-Batch erreichbaren Endkonzentrationen nur bedingt möglich ist. AKR91b, AKR92a und AKR102a zeigen von den untersuchten Stämmen jedoch die besten 1,3-Propandiol-Toleranzeigenschaften. Die erreichten 1,3-Propandiol-Konzentrationen liegen im Bereich der höchsten in der Literatur beschriebenen Werte von Fed-Batch Fermentationen (Willke und Vorlop, 2008). Daher wurden diese Stämme für die weitere Evaluierung eingesetzt.

Eine hohe Edukt-Toleranz ist Voraussetzung für den Einsatz im pH-geregelten Batch-Prozess. Für die 1,3-Propandiol-Produktion ist gerade der Einsatz im repeated Batch-Prozess interessant, da hier die Kosten für das Inokulum minimiert werden, wodurch der Prozess insgesamt wirtschaftlicher wird. Die maximale theoretische 1,3-Propandiol Ausbeute für *C. butyricum* und *K. pneumoniae* ist nach Zeng et al. (1993; 1996) 0,60 g/g, liegt in der Realität jedoch niedriger. Um eine Konzentration von 80 g/L 1,3-Propandiol zu erreichen und damit die Wirtschaftlichkeit der Produktaufreinigung zu gewährleisten, müssen ca. 150 g/L Glycerin eingesetzt werden. Die Produktbildung der Stämme AKR91b, AKR92a und AKR102a wurde in Mineralsalzmedium mit 100, 150 und 200 g/L Pharmaglycerin bzw. Rohglycerin (Charge 2, wie Anreicherungsphase) getestet. Die Inkubationsdauer wurde auf 7 d verlängert, da durch den Einsatz erhöhter Edukt-Konzentrationen und Rohglycerin die Lag-Phase verlängert und die Produktion verlangsamt werden kann (Colin et al., 2000; Rehman et al., 2008). Die Ergebnisse der Batch-Versuche sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

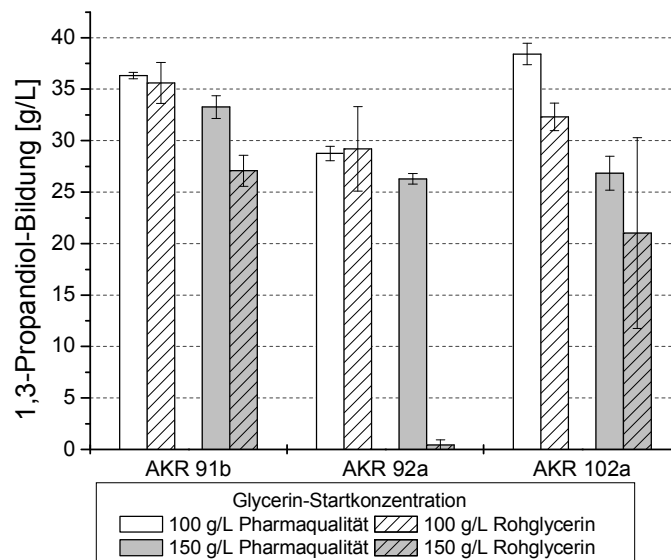


Abbildung 4.22: Evaluierung der (Roh-)Glycerin-Toleranz von AKR91b, AKR92a, AKR102a - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100, 150 und 200 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Die getesteten Stämme produzierten mit einer Pharmaglycerin-Vorlagen von 100 g/L 36,3 (AKR91b), 28,8 (AKR92a) und 38,4 g/L (AKR102a) 1,3-Propandiol, die Ausbeuten lagen bei

0,49, 0,49 und 0,45. Ebenso bildeten alle Stämme 1,3-Propandiol, wenn 150 g/L Pharmaglycerin vorgelegt wurden. Allerdings war die Produktion bei AKR102a bereits um 30 % verringert, während AKR91b und AKR92a nur um ca. 8 % gehemmt waren. Bei einer Glycerin-Vorlage von 200 g/L fand durch keinen der getesteten Stämme Produktbildung statt. Ein Einsatz im pH-geregelten Batch-Versuch ist jedoch grundsätzlich mit allen Stämmen möglich.

Die ermittelten Hemmwerte liegen im Bereich derer, die in der Literatur beschrieben sind. Colin et al. (2000) ermittelten für *C. butyricum* CNCM 1211 in pH-geregelten Batch-Versuchen bei einer Glycerin-Startkonzentration von 140 g/L eine maximale 1,3-Propandiol-Endkonzentration von 63,7 g/L. Eine deutliche Hemmung trat bei Einsatz von 150 g/L, eine komplette Hemmung bei 160 g/L Pharmaglycerin ein. Für *K. pneumoniae* M5a1 wurde im pH-geregelten Batch Versuch eine komplette Hemmung des Wachstums bereits durch 110 g/L Pharmaglycerin bei anaerober Kultivierung ermittelt (Cheng et al., 2004). Die Berechnungen von Zeng et al. (1994) aus experimentellen Daten ergaben für *C. butyricum* und *K. pneumoniae* eine Glycerin-Hemmkonzentration von 187,6 g/L.

Um den Einfluss des Rohglycerins auf die Stämme besser beurteilen zu können wurde die Rohglycerin-Toleranz nach Gleichung 4.1 berechnet (Abbildung 4.23).

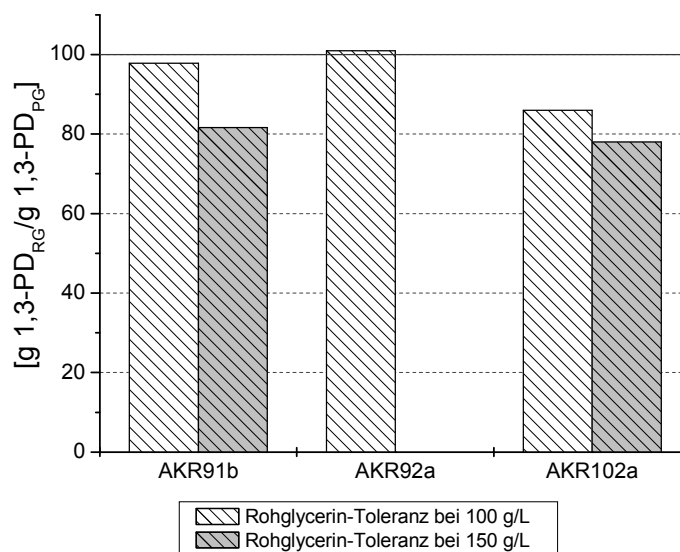


Abbildung 4.23: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz von AKR91b, AKR92a und AKR102a nach Gleichung 4.1 (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L und 150 g/L Roh- bzw. Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Alle Stämme waren in der Lage mit 100 g/L Rohglycerin 1,3-Propandiol zu bilden. AKR102a zeigte unter den hier gewählten Bedingungen eine Rohglycerin-Toleranz von 86 %, für AKR91b und AKR92a lag sie bei ca. 100 %.

Bei der Evaluierung der Kolonie-Kulturen im Zuge der Aufreinigung war die Fähigkeit, mit 100 g/L Rohglycerin 1,3-Propandiol zu bilden, bereits als Auswahlkriterium gewählt worden.

Die Kolonie-Kulturen, aus denen die getesteten Stämme hervorgingen, zeigten dort sehr gute Ergebnisse (vgl. Kapitel 4.4.1).

Bei Einsatz von 150 g/L Rohglycerin erreichten die Stämme AKR91b und AKR102a ca. 80 % Rohglycerin-Toleranz. AKR92a war bei 150 g/L Rohglycerin komplett gehemmt.

Der Einfluss des Rohglycerins auf Wachstum und Produktbildung ist von dessen Zusammensetzung abhängig. Auf Grund der großen Unterschiede (abhängig von Herstellungsprozess, Rohstoffen, Aufreinigungsstufe etc.) ist somit ein Vergleich mit Literaturwerten nur begrenzt aussagekräftig. So testeten beispielsweise Rehman et al. (2008) Rohglycerin aus der Herstellung von Biodiesel aus Sonnenblumenöl auf seine Verwertbarkeit durch *C. butyricum* DSMZ 5431. Ermittelt wurde die Wachstumshemmung durch vier unterschiedliche Aufreinigungsstufen des Rohglycerins in Batch-Versuchen ohne pH-Regelung. Die am stärksten gereinigte Stufe ermöglichte Wachstum bis zu einer Glycerin-Konzentration von 100 g/L, allerdings mit einer Hemmung von über 70 %. Ab einer Glycerin-Konzentration von 60 g/L wurde eine komplette Wachstumshemmung durch alle weiteren getesteten Qualitäten festgestellt. Gonzalez-Pajuelo et al. (2004) testeten die Verwertung drei unterschiedlicher Rohglycerin-Qualitäten aus der Biodiesel-Herstellung durch *Clostridium butyricum* VPI 3266. In Batch-Versuchen ohne pH-Regelung wurde bei Einsatz von 100 g/L Rohglycerin Wachstumshemmung im Bereich von 62 bis 86 % festgestellt.

Die Isolate AKR91b und AKR102a zeigten Wachstum und Produktbildung bei bis zu 150 g/L Rohglycerin. Somit ist eine Hemmung bzw. verringerte Produkt-Bildung in einem pH-geregelten Batch-Prozess zwar zu erwarten, jedoch ist grundsätzlich der Einsatz dieser Stämme mit Rohglycerin als Substrat möglich. Der hemmenden Effekte der Substrat-Startkonzentration bei Einsatz von Pharmaglycerin und der im Rohglycerin vorhandenen Verunreinigungen werden sich gegenseitig verstärken. Die Ergebnisse können nicht auf den Fed-Batch Prozess übertragen werden, so dass die untersuchten Stämme hier zusätzlich getestet werden müssen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Bedarf an extern zugegebenen Supplinen, die zum Erreichen hoher 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen notwendig sind.

Es wurde überprüft, inwiefern die isolierten Stämme durch verringerte Zugabe an Supplinen in ihrer Produktionskapazität eingeschränkt werden. Hierzu wurde der Umsatz von 100 g/L Pharmaglycerin mit normaler Zugabe an Hefeextrakt (2 g/L) und mit 1/10 des Hefeextraktes (0,2 g/L) ermittelt (vgl. Abbildung 4.24).

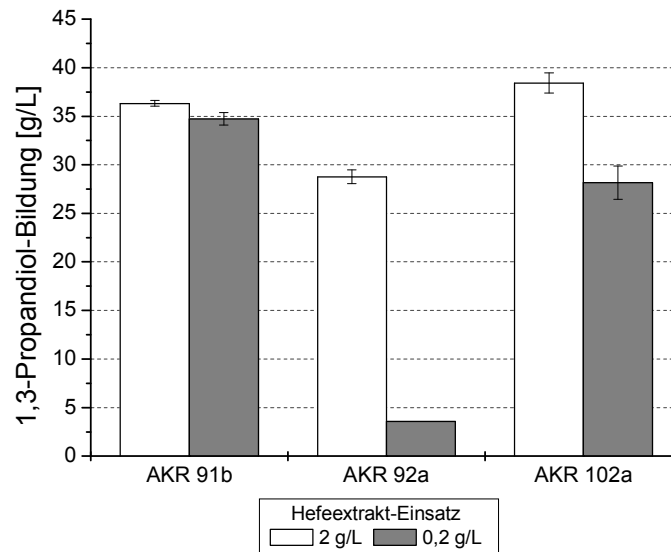


Abbildung 4.24: Evaluierung des Supplin-Bedarfes von AKR91b, AKR92a, AKR102a - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 bzw. 0,2 g/L Hefeextrakt, 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Der Stamm AKR91b zeigt den geringsten Supplin-Bedarf. Er erreicht 95 % der Endkonzentration an 1,3-Propandiol mit nur einem Zehntel des ursprünglich eingesetzten Hefeextraktes. Die Kolonie-Kultur, aus der dieser Stamm isoliert wurde, wurde ausgewählt, da sie in der Lage war, auch ohne Zugabe von Hefeextrakt 1,3-Propandiol zu bilden. Der Stamm AKR102a zeigt bei Verringerung des Hefeextraktes um 90 % eine Verringerung der 1,3-Propandiol-Bildung um 27 %. Der Stamm ist aber grundsätzlich in der Lage, mit wenigen Zusatzstoffen 1,3-Propandiol zu bilden. Der Stamm AKR92a hingegen ist deutlich gehemmt und zeigt eine um 86 % geringere 1,3-Propandiol-Konzentration.

Untersuchungen zum Bedarf an Supplinen für die 1,3-Propandiol-Produktion sind selten in der Literatur beschrieben. In Fed-Batch Fermentationen werden z. T. sehr hohe Hefeextrakt-Konzentrationen eingesetzt. Bock (2004) setzte zum Erreichen von 103,2 g/L 1,3-Propandiol durch *Clostridium* sp. IK123 5 g/L Hefeextrakt ein und führte über den Feed-Strom zusätzlich Hefeextrakt zu (80 % Glycerin, 40 g/L Hefeextrakt). Für den Stamm *C. butyricum* AKR102a aus dem Screening 2 wurde bei ähnlichem Vorgehen eine Endkonzentration 93,7 g/L erreicht, insgesamt wurden dazu 10,5 g/L Hefeextrakt eingesetzt (Wilkens et al., 2012). Zur Kultivierung von *K. pneumoniae* im Fed-Batch werden zumeist deutlich niedrigere Hefeextrakt-Konzentrationen im Bereich von 1 bis 2 g/L eingesetzt (Mu et al., 2006; Jun et al., 2009; Xu et al., 2009b).

Himmi et al. (1999) entwickelten ein Minimalmedium und verglichen die Umsetzung von 50 g/L Glycerin durch *C. butyricum* CNCM 1211 bei Zugabe von 2 g/L Hefeextrakt bzw. 200 µL/L Biotin. Die Werte für Endkonzentration, Produktivität und Ausbeute waren ver-

gleichbar, jedoch kam es zu einer stark verlängerten Lag-Phase, wenn nur Biotin supplementiert wurde. Mit dem Biotin-haltigen Medium konnten 129 g/L Pharma- und 121 g/L Rohglycerin durch vollständigen Umsatz im pH-geregelten Batch-Versuch zu 67 bzw. 65 g/L 1,3-Propandiol umgesetzt werden.

Die Ergebnisse der Evaluierung der Stämme AKR91b, AKR92a und AKR102s sind in Tabelle 4.30 zusammengefasst:

Tabelle 4.30: Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des Screening-Durchgangs 2

Stamm	1,3-PD Toleranz	Edukt-Toleranz	RG-Toleranz (150 g/L)	1/10 Hefeextrakt	Einstufung
AKR91b	+	++	+++	+++	sehr geeignet
AKR92a	+++	++	-	-	ungeeignet
AKR102a	+	++	+	+	geeignet

–: schlecht; +: gut; ++: sehr gut; +++: hervorragend

1,3-Propandiol-Toleranz Endkonzentration bei 1,3-PD-Vorlage: - < 80 g/L; + ≥ 80 g/L; ++ ≥ 90 g/L; +++ ≥ 100 g/L

Edukt-Toleranz – 1,3-PD-Bildung bei Glycerin-Vorlage von: - < 100 g/L; + 100 g/L; ++ 150 g/L; +++ 200 g/L

Rohglycerin-Toleranz und 1/10 Hefeextrakt: - < 70 %; + ≥ 70 %; ++ ≥ 80 %; +++ ≥ 90 %

Für die Einordnung der 1,3-Propandiol-Toleranz wurde die maximale gemessene Endkonzentration in den Evaluierungs-Versuchen herangezogen, bei der der 1,3-Propandiol-Produktion durch den Stamm stattgefunden hat. Die maximal erreichte Produktkonzentration lag z. T. höher als die 1,3-Propandiol-Vorlage, bei der die Isolate vollständig gehemmt waren, also kein 1,3-Propandiol mehr produzierten. Es wurde der gemessene Wert ohne Korrektur der Verdunstung verwendet, da nicht festgestellt werden kann, zu welchem Zeitpunkt der Inkubation die Hemmung eingetreten ist und wie stark die Verdunstung war. Die Kategorie-Bereiche der Rohglycerin Toleranz wurden wie im konventionellen Screening festgelegt (vgl. Kapitel 4.1.3, S.63).

Der Stamm AKR92a zeigte positive Ergebnisse bei 1,3-Propandiol- und Glycerin-Toleranz, wurde jedoch durch das verwendete Rohglycerin und eine Verringerung des eingesetzten Hefeextrakts stark gehemmt. Da ein Produktionsstamm durch Verwertung von Rohglycerin und geringe Nährstoffzugaben einen kostengünstigen Produktionsprozess ermöglichen soll, ist der Stamm AKR92a für einen solchen Prozess nicht geeignet.

Der Stamm AKR102a zeigte gute bis sehr gute Ergebnisse in allen relevanten Gebieten und wird somit für eine Evaluierung im Fermentationsmaßstab (pH-geregelter Batch bzw. Fed-Batch) ausgewählt, um sein Potential als Produktionsstamm genauer beurteilen zu können.

AKR91b zeigte in allen getesteten Bereichen gute bis hervorragende Ergebnisse, auch dieser Stamm wird daher für eine weitere Evaluierung im Bioreaktor empfohlen. Zuvor ist es jedoch notwendig eine genaue Identifizierung der Stämme durchzuführen, um Stämme der Risikogruppe 2 auszuschließen.

4.5.2 Reinkulturen des Screening-Durchgangs 3

In der Anreicherungs- und Kolonie-Evaluierungsphase dieses Screenings war es wiederholt zu Wachstumsproblemen bei der Übertragung der Kulturen in frisches Medium gekommen. Die Reinkulturen konnten auf Festmedium kultiviert werden, auch die Inokulation von Festmedium in Flüssigmedium verlief problemlos. Bei einer weiteren Übertragung dieser Kultursuspension in frisches Flüssigmedium erfolgte jedoch in der Regel kein Wachstum mehr. Die Probleme mussten für eine erfolgreiche Evaluierung zunächst geklärt und eine optimierte Kultivierungsstrategie entwickelt werden.

Das beobachtete Verhalten ließ auf die Produktion eines toxischen Metaboliten schließen, der während der Kultivierung gebildet wird und die lebensfähigen Zellen im Laufe der Kultivierung inaktiviert. Eine naheliegende Möglichkeit für einen solchen Metaboliten ist 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA), das Zwischenprodukt der 1,3-Propandiol-Synthese (Abbildung 2.6). Wachstumshemmung durch diesen Metaboliten ist in der Literatur häufig beschrieben, vor allem bei *Enterobacteriaceae* (Barbirato et al., 1996; Hao et al., 2008b). Um die Hypothese zu überprüfen, wurden die Reinkulturen in Standardmedium mit 25 und 50 g/L Pharmaglycerin kultiviert. Hierzu wurden Hungate-Röhrchen mit Kolonien von Festmedium beimpft und inkubiert. Nach 2 d wurden Proben zur Analyse entnommen. Die 1,3-Propandiol-Konzentrationen sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

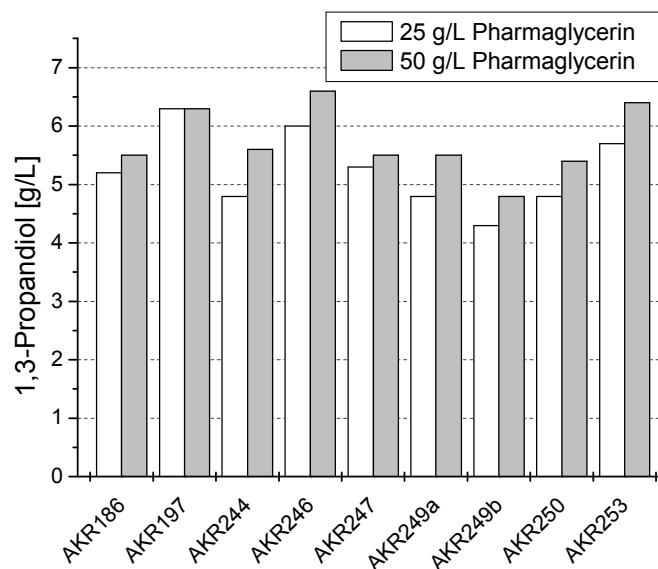


Abbildung 4.25: 1,3-Propandiol-Konzentration der Screening 3 Reinkulturen nach 2 d Kultivierung - Hungate-Röhrchen, Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 25 bzw. 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt

Mit Ausnahme von AKR197 wurde bei einer Vorlage von 50 g/L Pharmaglycerin mehr 1,3-Propandiol gebildet als bei Vorlage von 25 g/L, der Zuwachs liegt im Bereich von 5 bis

17 %. Keiner der Stämme verbrauchte das Substrat vollständig. Ebenso war der pH-Wert bei 50 g/L Pharmaglycerin-Vorlage niedriger als bei 25 g/L. Die Produktion war hier bereits abgeschlossen, was eine weitere Analyse nach 5 d Inkubation zeigte. Dies deutet darauf hin, dass bei einer Glycerin-Vorlage von 25 g/L ein vorzeitiger Abbruch der Fermentation stattgefunden hat.

Die Proben wurden daraufhin auf die Anwesenheit von 3-HPA mittels des modifizierten kolorimetrischen Tests nach Circle et al. (Circle et al., 1945) untersucht (vgl. Kapitel 3.3.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.26 dargestellt.

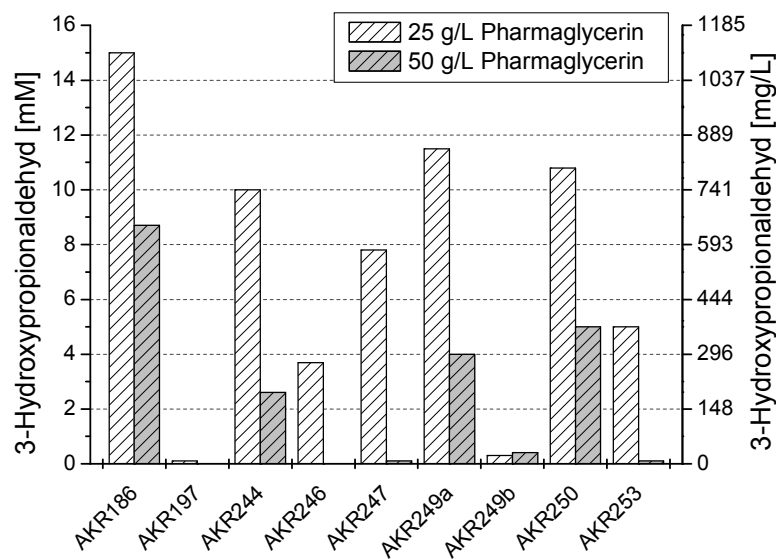


Abbildung 4.26: 3-HPA-Konzentration der Reinkulturen des Screenings 3 nach 2 d Kultivierung - Hungate-Röhrchen, Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 25 bzw. 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt

In allen Kulturen, außer AKR197 und AKR249b, konnte bei einer Glycerin-Vorlage von 25 g/L 3-HPA nachgewiesen werden. Die Konzentrationen reichten hierbei von 3,7 bis 15 mmol/L. Nach Barbirato et al. (1996) liegen die Hemmkonzentrationen für *Enterobacter agglomerans* bei ca. 30 mM, für *Klebsiella pneumoniae* bei ca. 24 mM und für *Citrobacter freundii* bei ca. 17 mM 3-HPA. Die hier vorliegenden Konzentrationen sind zwar niedriger, allerdings war der Prozess zum Zeitpunkt der Probenahme bereits abgeschlossen. 3-HPA wird jedoch durch die 1,3-Propandiol Oxidoreduktase stetig abgebaut. Somit ist es wahrscheinlich, dass während der Wachstumsphase höhere Konzentrationen vorlagen. Tatsächlich war nach 5 d Inkubation das 3-HPA in den Kulturen AKR246, AKR247 und AKR253 komplett abgebaut, in den Kulturen AKR186, AKR244, AKR249a und AKR250 waren die Konzentrationen erheblich verringert (um 42 bis 74 %).

Bei einer Glycerin-Vorlage von 50 g/L konnte nach 2 d 3-HPA für die Kulturen AKR186, AKR144, AKR249a und AKR250 nachgewiesen werden, jedoch in wesentlich geringerem Umfang als bei 25 g/L Vorlage.

Um die Hypothese der Hemmung durch 3-HPA zu überprüfen, wurden die Kulturen mit 50 g/L Glycerin-Vorlage auf frisches Medium gleicher Zusammensetzung übertragen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.31 dargestellt.

Tabelle 4.31: Ergebnisse der Screening 3 Reinkulturen nach 2 d Kultivierung - Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt

Stamm	Ergebnisse nach 2 d Inkubation			Wachstum nach Neuinokulation
	1,3-PD [g/L]	3-HPA [mmol/L]	pH-Wert [-]	
AKR186	5,5	8,7	5,76	-
AKR197	6,3	0,0	5,39	+
AKR244	5,6	2,6	5,67	-
AKR246	6,6	0,0	5,41	-
AKR247	5,5	0,1	5,47	+
AKR249a	5,5	4,0	5,73	-
AKR249b	4,8	0,4	4,95	+
AKR250	5,4	5,0	5,76	-
AKR253	6,4	0,1	5,48	-

Die Kulturen, die 3-HPA enthielten (AKR186, AKR244, AKR249a, AKR250), zeigten nach der Übertragung in frisches Medium kein Wachstum. Von denen, die wenig bis kein 3-HPA enthielten konnten AKR246 und AKR253 nicht übertragen werden. Wenn der toxische Metabolit jedoch auch nach Abschluss der Wachstums- und Produktionsphase noch abgebaut wird, ist es möglich, dass die Zellen dieser Kulturen durch 3-HPA bereits geschädigt waren. AKR197, AKR247 und AKR249b zeigten Wachstum bei Übertragung in frisches Medium. Entweder bilden diese Spezies geringere 3-HPA Mengen oder sie sind resistenter gegenüber den toxischen Effekten. Die Ergebnisse weisen somit auf eine Wachstumshemmung durch 3-HPA hin.

Für die Stammhaltung der Reinkulturen, sowie für die Herstellung von Kryo-konservierten Kulturen wurde das Substrat im Standardmedium gewechselt. Bei Einsatz von Glucose (10 g/L) findet die Umsetzung zu 1,3-Propandiol nicht statt und 3-HPA wird nicht gebildet. Eine Übertragung der Kulturen von Flüssigmedium mit Glucose als Substrat auf Glycerinhaltiges Flüssigmedium war so nach längerer Inkubation bzw. Lagerung bei 4°C möglich.

Für die weitere Evaluierung der Isolate wurde zunächst der Einfluss des Substrates in den Vorkulturen geklärt. Die Vorkulturen von AKR186, AKR197, AKR246, AKR247, AKR249b und AKR253 wurden einerseits mit 50 g/L Pharmaglycerin und andererseits mit 10 g/L Glucose verwendet. Es wurden 50 g/L Pharmaglycerin statt 25 g/L eingesetzt, um die Bildung von 3-HPA zu minimieren. Um den Einfluss beurteilen zu können, wurde die 1,3-Propandiol-

Bildung mit 60 g/L Pharmaglycerin evaluiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 dargestellt.

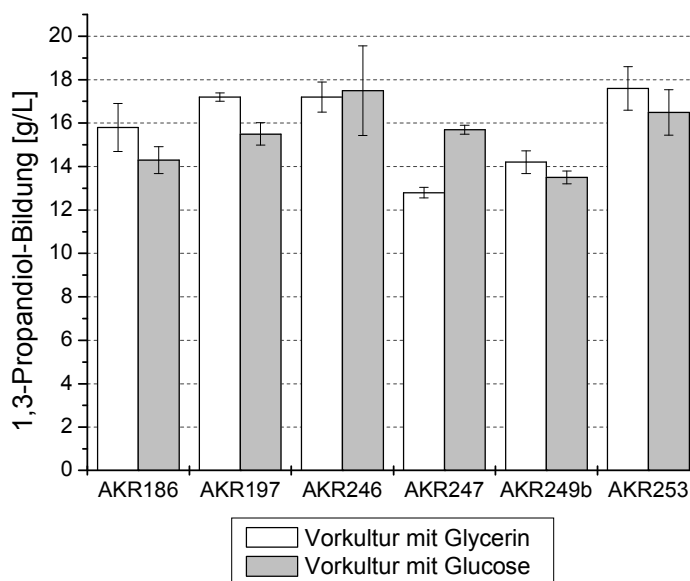


Abbildung 4.27: Einfluss des Vorkultursubstrates auf die Evaluierung – Vorkulturen enthielten 50 g/L Pharmaglycerin bzw. 10 g/L Glucose, getestet wurden AKR197, 186, 246, 247, 249b und 253. 1,3-Propandiol- nach 5 d (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Unabhängig von der Vorkultur kam es durch die getesteten Stämme während der Evaluierung zu 1,3-Propandiol-Bildung. Die Höhe der erreichten Endkonzentrationen wurde durch das in der Vorkultur verwendete Substrat nur geringfügig beeinflusst. Insgesamt war die 1,3-Propandiol-Endkonzentration bei einer Glycerin-haltigen Vorkultur höher oder gleich. Nur für den Stamm AKR247 war eine deutliche Verbesserung der 1,3-Propandiol-Bildung (um 23 %) bei Verwendung von Glucose in der Vorkultur zu beobachten.

Das Alter des Inokulum war mit 20 h gering. Die pH-Werte der Kulturen lagen zu diesem Zeitpunkt noch deutlich über 6, die Vorkulturen waren demnach noch in der Wachstums- bzw. Produktionsphase und die verwendeten Zellen noch lebensfähig.

Da kaum negative Effekte bei Einsatz von Glycerin in der Vorkultur beobachtet wurden, wurde für alle Evaluierungsversuche dieses Screenings 50 g/L Glycerin als Substrat in der Vorkultur eingesetzt.

Die Stämme AKR197, 186, 244, 246, 247, 249a, 249b, 250, 253 und 263 (vgl. Tabelle 4.26) wurden hinsichtlich der im Screening 3 angestrebten Stammeigenschaften evaluiert. Neben hoher 1,3-Propandiol-Toleranz und Rohglycerin-Verwertung, sollten vor allem die Nährstoffanforderungen der Produktionsstämme geprüft werden (vgl. Kapitel 4.3.2, Tabelle 4.15).

Die Evaluierungsversuche wurden unter den optimierten Bedingungen (vgl. Kapitel 4.2) im Vierfachansatz durchgeführt. Zunächst sollte das Hauptentscheidungskriterium

1,3-Propandiol-Toleranz untersucht werden. Hierzu wurde 1,3-Propandiol in 4 Konzentrationsstufen im Bereich von 60 bis 90 g/L vorgelegt. Zusätzlich wurde Medium ohne 1,3-Propandiol als Referenz eingesetzt. Die Glycerin-Konzentration betrug in allen Medien 60 g/L. Die vorgelegten 1,3-Propandiol-Konzentrationen sind im Vergleich zur Evaluierung der Reinkulturen des 2. Screening-Durchgangs (vgl. Kapitel 4.5.1) höher gewählt. Dort war es bei der höchsten 1,3-Propandiol-Vorlage (77 g/L) nicht mehr zu einer kompletten Hemmung des Stammes AKR92a gekommen (vgl. Abbildung 4.20). Zudem sind die hier vorliegenden Stämme zumeist aus einer Anreicherung mit bereits sehr hoher 1,3-Propandiol-Vorlage (80 g/L) isoliert worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.28 dargestellt.

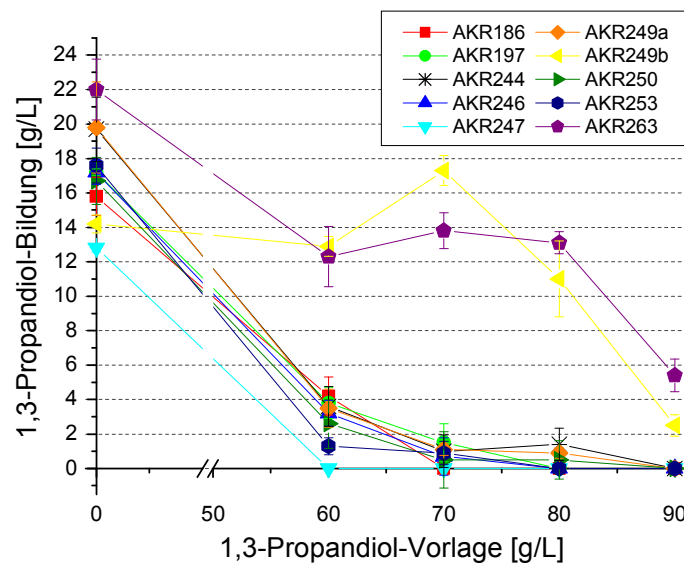


Abbildung 4.28: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR197, 186, 244, 246, 247, 249a, 249b, 250, 253 und 263 – 1,3-Propandiol-Zunahme nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 60, 70, 80 und 90 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C 350, upm); rechnerisch korrigierte Werte

Ohne Produktvorlage bildeten die getesteten Stämme 1,3-Propandiol im Bereich von 13 und 22 g/L. Bereits bei der Vorlage von 60 g/L 1,3-Propandiol war die Mehrzahl der Stämme deutlich gehemmt. Alle Stämme außer AKR249b und AKR263 bildeten weniger als 5 g/L 1,3-Propandiol. AKR249b wurde kaum gehemmt durch 1,3-Propandiol bis zu einer Vorlage von 80 g/L. Bei 90 g/L Produkt-Vorlage war die 1,3-Propandiol-Bildung jedoch um 82 % reduziert. AKR263 produzierte zwar geringere Produktkonzentrationen (38 - 44 % Verringerung), die Hemmung war jedoch bis zu einer Vorlage von 80 g/L 1,3-Propandiol konstant. Auch bei 90 g/L 1,3-Propandiol bildete AKR263 noch Produkt, allerdings mit einer Verringerung der 1,3-Propandiol-Bildung um 75 %.

AKR249b und AKR263 werden auf Grund ihrer guten Produkt-Toleranz in Abbildung 4.29 genauer dargestellt.

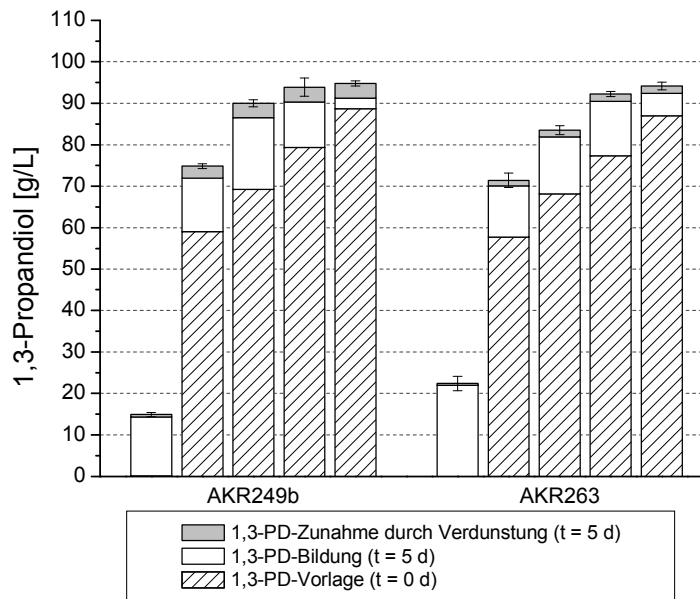


Abbildung 4.29: Evaluierung der 1,3-Propanediol-Toleranz von AKR249b und AKR263 – 1,3-Propanediol-Vorlage, -Zunahme durch Bildung und -Zunahme durch Verdunstung nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 60, 70, 80 und 90 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Der Stamm AKR249b produzierte 1,3-Propanediol im Bereich von 11 und 17 g/L bis zu einer Vorlage von 80 g/L Produkt. Erst ab 90 g/L Vorlage war der Stamm gehemmt, die gemessene Endkonzentration betrug 94,9 g/L 1,3-Propanediol. AKR263 bildete 22 g/L 1,3-Propanediol ohne Produktvorlage und 12 bis 14 g/L bis zu 80 g/L 1,3-Propanidol-Vorlage. Erneut trat eine deutliche Hemmung bei 90 g/L auf, der Stamm erreichte die gemessene Endkonzentration von 94,2 g/L. Die durch die Stämme AKR249b und AKR263 tolerierten 1,3-Propanediol-Konzentrationen liegen über 90 g/L und somit deutlich oberhalb der in der Literatur beschriebenen Hemmkonzentrationen von 50 bis 70 g/L (Zeng et al., 1994; Colin et al., 2000; Overmann, 2006; Otte et al., 2009).

Weiterhin wurde die Edukt-Toleranz der Stämme AKR249b und AKR263 getestet. Die Stämme wurden auf Wachstum und Produktbildung mit 100, 150 und 200 g/L Pharmaglycerin bzw. Rohglycerin (Charge 2) getestet. Auf Grund der veränderten Zusammensetzung der Nebenprodukte (s. u.) wurde die Konzentration der eingesetzten pH-Puffersubstanz Calciumcarbonat auf 30 g/L erhöht. Die Inkubationsdauer wurde auf Grund der hohen Substrat- bzw. Rohglycerin-Konzentrationen auf 7 d festgelegt. Die Ergebnisse der Evaluierung der Edukt-Toleranz sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

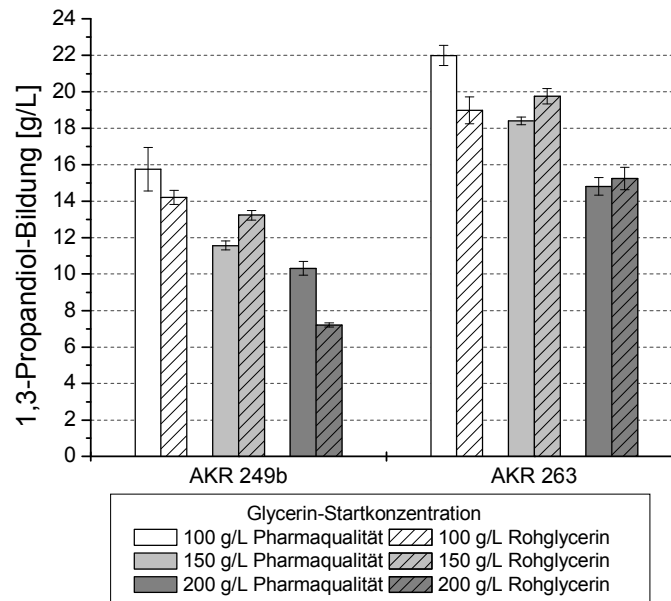


Abbildung 4.30: Evaluierung der (Roh-)Glycerin-Toleranz der Stämme AKR249b und AKR263 - 1,3-Propanediol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100, 150 und 200 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 30 g/L CaCO_3 , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Die Stämme AKR249b und AKR263 zeigten sehr gute Toleranz gegenüber Pharma- und Rohglycerin. Produktbildung war bis zu 200 g/L Pharma- oder Rohglycerin möglich. Die tolerierten Substrat-Konzentrationen lagen weit über denen, die in der Literatur beschrieben wurden (160 g/L für *C. butyricum* CNCM 1211 (Colin et al., 2000); 110 g/L für *K. pneumoniae* M5al (Cheng et al., 2004), 187,6 g/L für *C. butyricum* und *K. pneumoniae* (Zeng et al., 1994)). Allerdings waren die erreichten Endkonzentrationen deutlich niedriger als bei den getesteten Reinkulturen des Screening 2 (vgl. Abbildung 4.22). Bei Vorlage von 100 g/L Pharmaglycerin wurden lediglich 16 bzw. 22 g/L 1,3-Propanediol gebildet. AKR249b wurde bei hohen Glycerin-Konzentrationen deutlich gehemmt. Bei 150 g/L Glycerin bildete er noch 74 % bei 200 g/L noch 65 % der 1,3-Propanediol-Konzentration, die bei 100 g/L Glycerin-Startkonzentration gebildet wurden. Die Werte für AKR263 lagen mit 84 % bzw. 67 % etwas höher.

Bei Einsatz von Pharmaglycerin war die Ausbeute der untersuchten Stämme gering. Für AKR249b lag diese zwischen 0,37 bei 100 g/L und 0,33 bei 200 g/L Glycerin. Für AKR263 war die Ausbeute mit 0,41 bis 0,36 geringfügig besser. Als Nebenprodukte wurde Milchsäure in hoher Konzentration gebildet, zudem wurden Ethanol, Essigsäure und Bernsteinsäure nachgewiesen.

Die Rohglycerin Toleranz der Stämme wurde für die drei untersuchten Konzentrationen nach Gleichung 4.1 (Seite 62) berechnet.

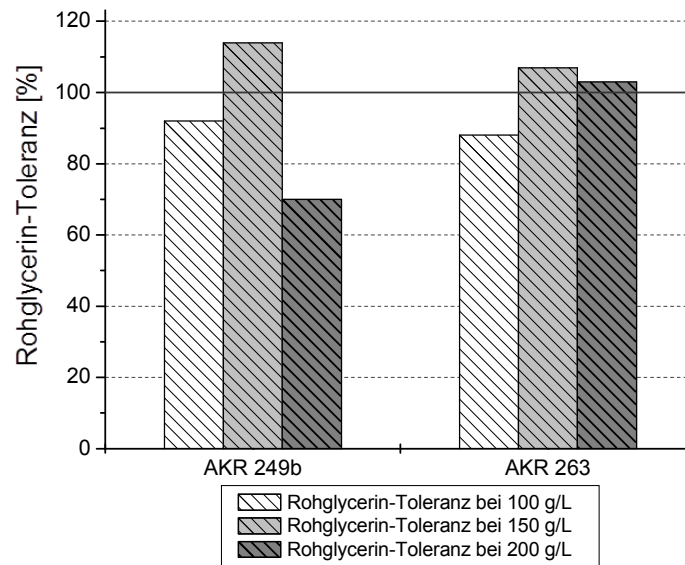


Abbildung 4.31: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz der Stämme AKR249b und AKR263 nach Gleichung 4.1 nach 7 d Kultivierung (optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L, 150 g/L und 200 g/L Roh- bzw. Pharmaglycerin, 30 g/L CaCO_3 , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Beide Stämme zeigen bei Vorlage von 100 g/L Glycerin bezogen auf die 1,3-Propandiol-Bildung eine Rohglycerin-Toleranz von ca. 90 %. Bei 150 g/L Glycerin wird für beide Stämme eine Rohglycerin-Toleranz über 100 % ermittelt, die Produktbildung ist hier sogar besser als bei Einsatz von Pharmaglycerin. Bei einer Konzentration von 200 g/L ist der Stamm AKR249b mit einer Toleranz von 70 % deutlich gehemmt, AKR263 dagegen zeigt noch immer eine Toleranz über 100 %. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das verwendete Rohglycerin Bestandteile enthält, die das Wachstum der vorliegenden Mikroorganismen fördert. Hierbei könnte es sich um weitere organische Bestandteile im Rohglycerin handeln.

Eine höhere 1,3-Propandiol-Bildung bei Vorlage von Rohglycerin ist ungewöhnlich. In der Literatur sind zahlreiche Fälle beschrieben, in denen Produktionsstämme durch den Einsatz von Rohglycerin gehemmt werden (Gonzalez-Pajuelo et al., 2004; Hirschmann et al., 2005; Mu et al., 2006; Rehman et al., 2008; Moon et al., 2009). Für *K. pneumoniae* DSMZ 4799 wurde ein fördernder Effekt auf die 1,3-Proapndiol-Produktion beobachtet (Jun et al., 2009). In Batch Versuchen ohne pH-Regelung führte der Einsatz von 20 - 80 g/L Rohglycerin zu höheren 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen als der Einsatz von Pharmaglycerin der gleichen Konzentrationen. Im Fed-Batch Prozess zeigte dieser Stamm bei Einsatz von Rohglycerin eine verbesserte Produktivität und eine um 27 % höhere 1,3-Propandiol-Konzentration von 80,2 g/L nach 69 h. Auch bei diesen Arbeiten wurde mit 2 g/L eine geringe Hefeextrakt-Konzentration eingesetzt. Die sehr lange Produktionsphase von fast 3 d deutet auf eine Limi-

tierung des Wachstums hin. Die Beschleunigung der Produktbildung kann somit auch hier durch das Wachstum fördernde Inhaltstoffe des Rohglycerins erklärt werden.

Die Ausbeuten der Isolate sind sehr gering (ca. 0,4 g/g). Im pH-geregelten Batch müsste demnach mehr Glycerin (ca. 200 g/L) zum Erreichen einer Endkonzentration von 80 g/L 1,3-Propandiol eingesetzt werden als bei den in der Literatur beschriebenen Stämmen, jedoch sind die Stämme grundsätzlich in einen Batch- bzw. Fed-Batch Prozess mit Rohglycerin einsetzbar.

Das Anreicherungsmedium des dritten Screening-Durchgangs (vgl. Kapitel 4.3.2) enthielt verringerte Mengen an Hefeextrakt bzw. Vitaminlösung als Ersatz. Der Einfluss verringerter Nährstoffzugabe auf die 1,3-Propandiol-Bildung der Reinkulturen wurde nun evaluiert.

100 g/L Pharmaglycerin wurden unter optimierten Evaluierungsbedingungen mit normaler Hefeextrakt-Konzentration (2 g/L), mit 1/10 des Hefeextraktes (0,2 g/L) und mit Vitaminlösung als Supplementation umgesetzt (vgl. Abbildung 4.32).

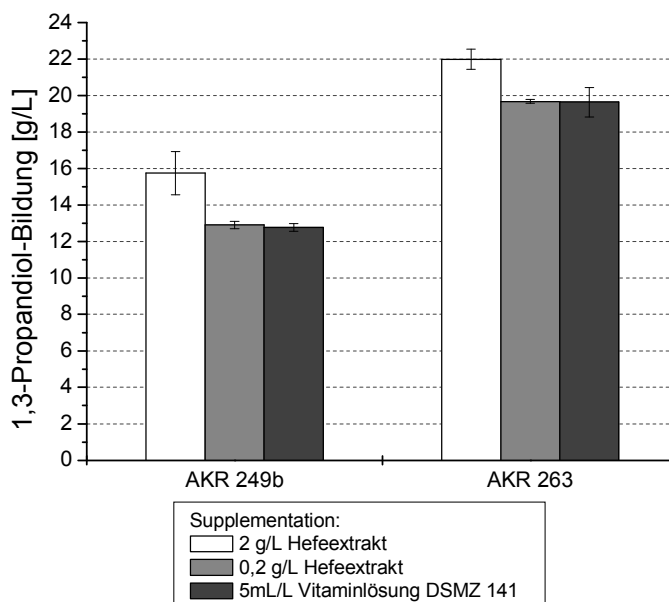


Abbildung 4.32: Evaluierung des Supplin-Bedarfes von AKR249b und AKR263 - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 bzw. 0,2 g/L Hefeextrakt, 5 mL/L Vitaminlösung DSMZ 141; 30 g/L CaCO₃, 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Beide Stämme sind in der Lage mit verringerter Nährstoffzugabe 1,3-Propandiol zu bilden. Der Stamm AKR249b bildete ca. 80 %, AKR263 ca. 90 % des 1,3-Propandiol, das unter Standardbedingungen ermittelt wurde. Bei Verringerung bzw. Ersatz des Hefeextraktes durch Vitaminlösung wurden vergleichbar hohe 1,3-Propandiol-Konzentrationen erreicht.

Die Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der Stämme AKR249b und AKR263 sind in Tabelle 4.32 zusammengefasst:

Tabelle 4.32: Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des dritten Screening-Durchgangs

Stamm	1,3-PD Toleranz	Edukt-Toleranz	RG-Toleranz (150 g/L)	1/10 Hefeextrakt	Vitaminlösung DSMZ 141	Einstufung
AKR249b	++	+++	++++	++	++	geeignet
AKR263	++	+++	++++	+++	+++	Sehr geeignet

-: schlecht; +: gut; ++: sehr gut; +++: hervorragend; ++++ fördernd

1,3-Propandiol-Toleranz Endkonzentration bei 1,3-PD-Vorlage: - < 80 g/L; + ≥ 80 g/L; ++ ≥ 90 g/L; +++ ≥ 100 g/L

Edukt-Toleranz – 1,3-PD-Bildung bei Glycerin-Vorlage von: - < 100 g/L; + 100 g/L; ++ 150 g/L; +++ 200 g/L

Rohglycerin-Toleranz und 1/10 Hefeextrakt: - < 70 %; + ≥ 70 %; ++ ≥ 80 %; +++ ≥ 90 %

Beide Stämme zeigen sehr gute bis hervorragende Produktionseigenschaften und werden für eine Evaluierung im pH-geregelten Bioreaktor vorgeschlagen. Eine vorherige Identifizierung muss jedoch noch die Sicherheitseinstufung der Stämme klären.

4.5.3 Reinkulturen des Screening-Durchgangs 4

Acht Reinkulturen des vierten Screenings (vgl. Kapitel 4.4.4, Tabelle 4.29) wurden im sekundären Screening auf ihre 1,3-Propandiol- und (Roh-)Glycerin-Toleranz und die Nutzung von günstigen, komplexen Medienbestandteilen (vgl. Kapitel 4.3.4, Tabelle 4.21) getestet.

Zur Bestimmung der 1,3-Propandiol-Toleranz wurde in vier Konzentrationsstufen (70 bis 100 g/L) 1,3-Propandiol und 60 g/L Glycerin vorgelegt. Als Referenz wurde Medium ohne 1,3-Propandiol-Vorlage verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.33 dargestellt.

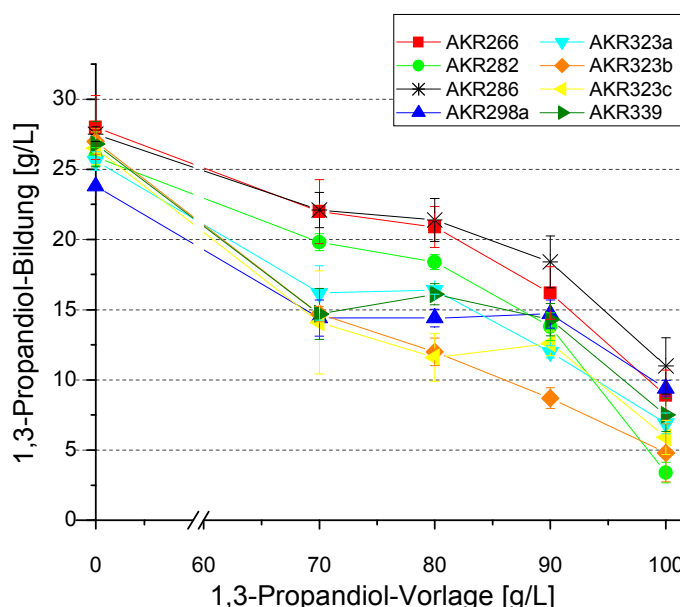


Abbildung 4.33: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a, AKR323b, AKR323c und AKR339 – 1,3-Propandiol-Zunahme nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 70, 80, 90, 100 g/L 1,3-Propanidol, 30 g/L CaCO₃, anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Die Produkt-Konzentrationen zur Vorlage in dieser Evaluierung wurden wiederum erhöht als Reaktion auf die sehr selektiven Anreicherungsbedingungen und die in der Kolonie-Evaluierung durchgeführte Vorselektion (80 g/L Produktvorlage, vgl. Kapitel 4.4.4).

Alle getesteten Stämme zeigten sehr gute 1,3-Propandiol-Toleranz und bilden 1,3-Propandiol noch bei Vorlage von 100 g/L Produkt. AKR286 bildete mit 28 bis 11 g/L die höchsten Produktkonzentrationen und wurde am wenigsten durch zunehmende 1,3-Propandiol-Vorlagen gehemmt (um 20 bis 60 %). Die Stämme AKR266 und AKR282 waren bis zu einer 1,3-Propandiol-Vorlage von 80 g/L ebenfalls nur geringfügig gehemmt (ca. um 25 %), erst bei 90 g/L Vorlage verringerte sich die Produktbildung deutlich (um 42 bzw. 47 %). Diese drei Stämme wurden für eine weitere Evaluierung ausgewählt.

Zusätzlich wurden AKR298a und AKR323a für die Evaluierung verwendet. Diese Stämme bildeten zwar bei Vorlage des Produktes um ca. 60 % verringerte 1,3-Propandiol-Konzentrationen (ca. 14 g/L für AKR298a und 16 g/L für AKR323a). Die Hemmung blieb jedoch für AKR298a bis zu einer Vorlage von 90 g/L konstant, für AKR323a bis 80 g/L und war geringer als die Hemmung der Stämme AKR323b, AKR323c und AKR339.

Die Stämme AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a werden in Abbildung 4.34 genauer dargestellt.

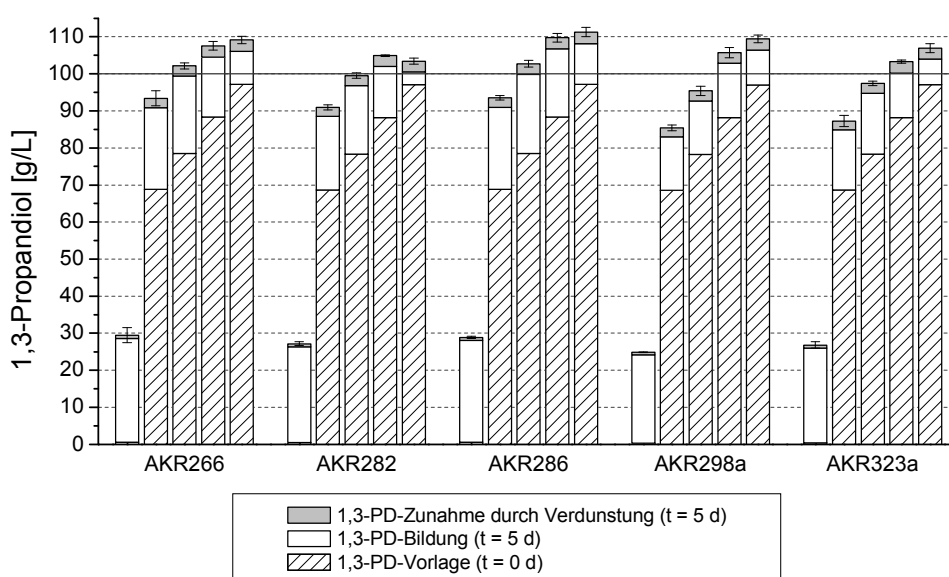


Abbildung 4.34: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a – 1,3-Propandiol-Vorlage, –Zunahme durch Bildung und –Zunahme durch Verdunstung nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 70, 80, 90 und 100 g/L 1,3-Propanidol, 30 g/L CaCO_3 , anaerob 32°C 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Alle Stämme erreichen 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen über 100 g/L. Für AKR286 wurde mit 111 g/L der höchste Wert ermittelt. AKR266 und 298a wiesen mit je 109 g/L ebenfalls

sehr hohe Endkonzentrationen auf. Trotz insgesamt abnehmender 1,3-Propandiol-Bildung durch die Stämme mit zunehmender 1,3-Propandiol-Vorlage stieg die gemessene Endkonzentration an. Nur AKR282 erreichte bei Vorlage von 100 g/L 1,3-Propandiol einen geringeren Endwert als bei 90 g/L Vorlage und näherte sich dem Grenzwert von ca. 104 g/L.

Die gemessenen 1,3-Propandiol-Endkonzentrationen übersteigen die beschriebenen Hemmkonzentrationen für *C. butyricum* und *K. pneumoniae* bei Weitem (50 g/L (Otte et al., 2009), 65 g/L (Colin et al., 2000), 71,4 g/L (Zeng et al., 1994)). Die Werte liegen auch über den in der Literatur für Wild-Typ 1,3-Propandiol-Produzenten beschriebenen Fed-Batch-Konzentrationen (95,4 g/L *Klebsiella pneumoniae* HR526 (Xu et al., 2009a), 103,2 g/L *Clostridium* sp. IK123 (Bock, 2004)).

Es ist jedoch zu beachten, dass die oben ermittelten Werte von den Versuchsbedingungen und der Art und Menge der Nebenprodukte abhängig sind. Ob die Stämme im pH-geregelten Bioreaktor ebenfalls hohe Endkonzentrationen erreichen, gilt es zu klären.

Zur Beurteilung der Edukt-Toleranz wurden AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a mit 100, 150 und 200 g/L Pharmaglycerin bzw. Rohglycerin evaluiert. Im Screening-Durchgang 4 wurde Rohglycerin der Charge 3 eingesetzt, so dass diese Qualität auch in der Evaluierung Verwendung fand. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.35 dargestellt.

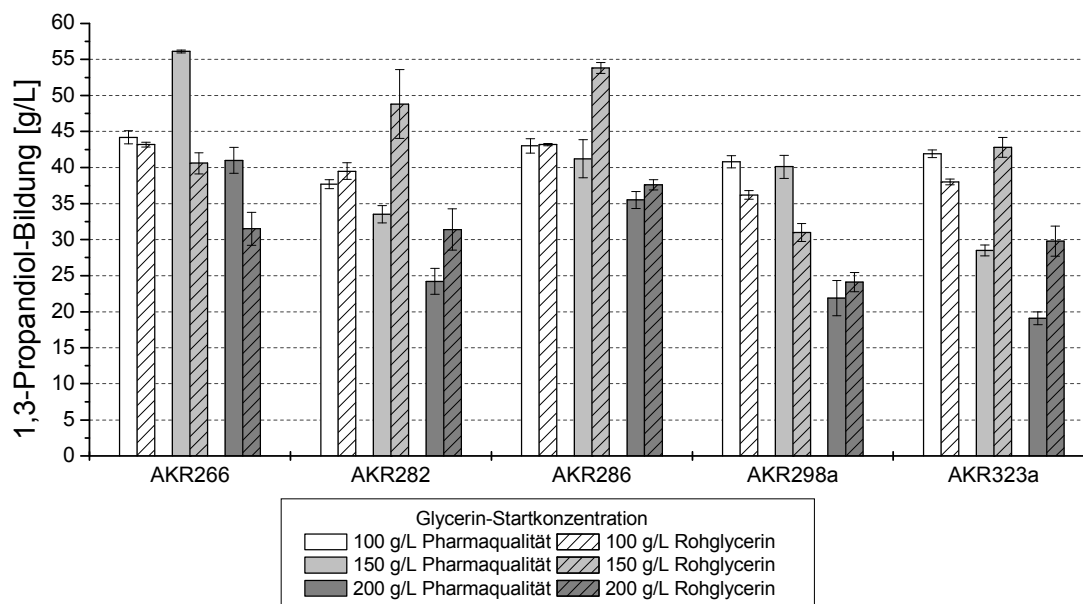


Abbildung 4.35: Evaluierung der (Roh-)Glycerin-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100, 150 und 200 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 30 g/L CaCO_3 , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Alle Stämme produzierten 1,3-Propandiol mit 100, 150 und 200 g/L Pharma- und Rohglycerin und zeigen somit sehr gute Toleranz-Eigenschaften. Wie in Kapitel 4.5.2 liegen diese

Konzentrationen über den in der Literatur beschriebenen Hemmkonzentrationen (110 – 190 g/L (Zeng et al., 1994; Colin et al., 2000; Cheng et al., 2005)). Die Ausbeute bei Einsatz von 100 g/L Pharmaglycerin war für AKR266 und AKR286 mit 0,49 g/g am höchsten, für die anderen Stämme lagen die Ausbeuten bei 0,42 bis 0,44 g/g. Die Nebenprodukte waren neben Milch-, Bernstein- und Essigsäure vor allem 2,3-Butandiol und Ethanol.

Die Konzentrationen an 1,3-Propandiol für die Umsetzung von 100 g/L Pharmaglycerin liegen zwischen 38 und 44 g/L, sind im Vergleich zu den bisherigen Evaluierungs-Durchgängen hoch. Bei der Verwertung von Pharmaglycerin fällt zudem auf, dass AKR286 und AKR298a nahezu keine Hemmung bei Erhöhung der Substratkonzentration von 100 auf 150 g/L zeigen. Der Stamm AKR266 bildet sogar 27 % mehr Produkt, die Endkonzentration bei 150 g/L Glycerin beträgt 56 g/L 1,3-Propandiol. Dies ist die höchste Konzentration, die ihm Rahmen der Evaluierungen aller Screening-Durchgänge erreicht werden konnte. Dies ist, neben Stammeigenschaften, auch auf die Nebenprodukte der Umsetzung zurückzuführen (s. o.). Da Stoffwechselprodukte wie Ethanol und 2,3-Butandiol den pH-Wert nicht beeinflussen, war die Produktionsphase verlängert. AKR266 und AKR286 sind auch durch 200 g/L Pharmaglycerin kaum gehemmt (um 7 bzw. 18 %), AKR298a zeigt dagegen nur noch 54 % der Produktbildung. Die Isolate AKR282 und AKR323a werden mit zunehmender Glycerin-Startkonzentration deutlich gehemmt in der 1,3-Propandiol-Bildung.

Weiter wurde die Rohglycerin-Toleranz der Stämme nach Gleichung 4.1 verglichen (Abbildung 4.36).

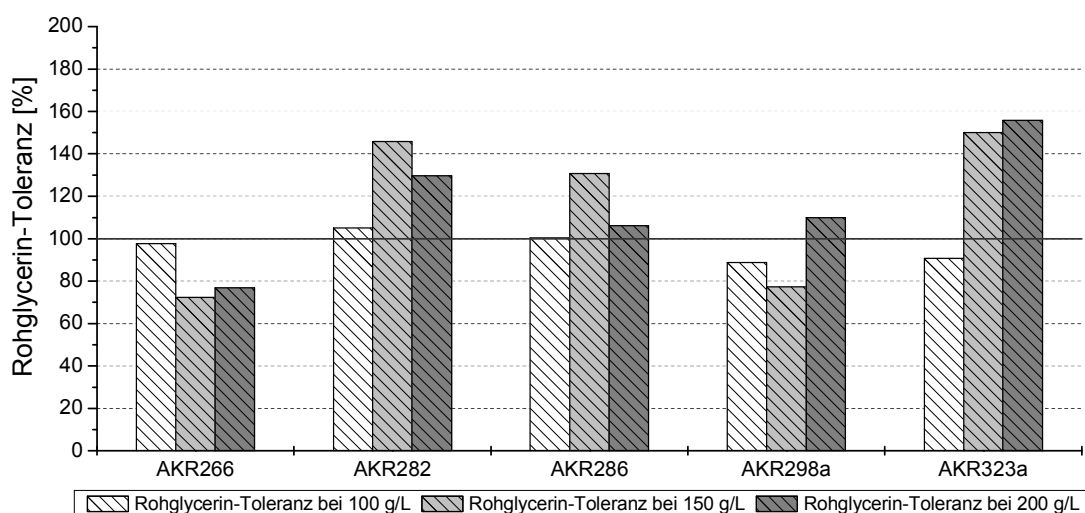


Abbildung 4.36: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a nach Gleichung 4.1 nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L, 150 g/L und 200 g/L Rohglycerin (Charge3) bzw. Pharmaglycerin, 30 g/L CaCO₃, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Die Stämme AKR282 und AKR286 zeigten bei allen getesteten Glycerin-Konzentrationen hervorragende Rohglycerin-Toleranz. Die Toleranz-Werte lagen z. T. deutlich über 100 %. Besonders bei Einsatz von 150 g/L Rohglycerin bildete AKR282 46 % und AKR286 31 % mehr 1,3-Propandiol als bei Einsatz von Pharmaglycerin. Dieses Verhalten war bereits in der Evaluierung der Kolonie-Kulturen, aus denen die Stämme aufgereinigt wurden, beobachtet worden. AKR323a wies bei 100 g/L Glycerin-Einsatz zwar eine Rohglycerin-Toleranz unter 100% auf, hatte aber bei höheren Glycerin-Konzentrationen die bei Weitem besten Toleranzwerte, 150 % bei 150 g/L und 156 % bei 200 g/L.

Der Effekt wurde bereits bei der Evaluierung der Reinkulturen des dritten Screening-Durchgangs beobachtet und diskutiert (vgl. Kapitel 4.5.2). Er tritt jedoch im aktuellen Screening verstärkt auf. Da hier Rohglycerin einer neuen Qualität (Charge 3, vgl. Kapitel 3.1.4) Einsatz fand, wurde überprüft wie die Reinkulturen sich bei Wachstum mit Rohglycerin der alten Zusammensetzung (Charge 2) verhalten. Die ermittelten Rohglycerin-Toleranzen sind in Abbildung 4.37 wiedergegeben.

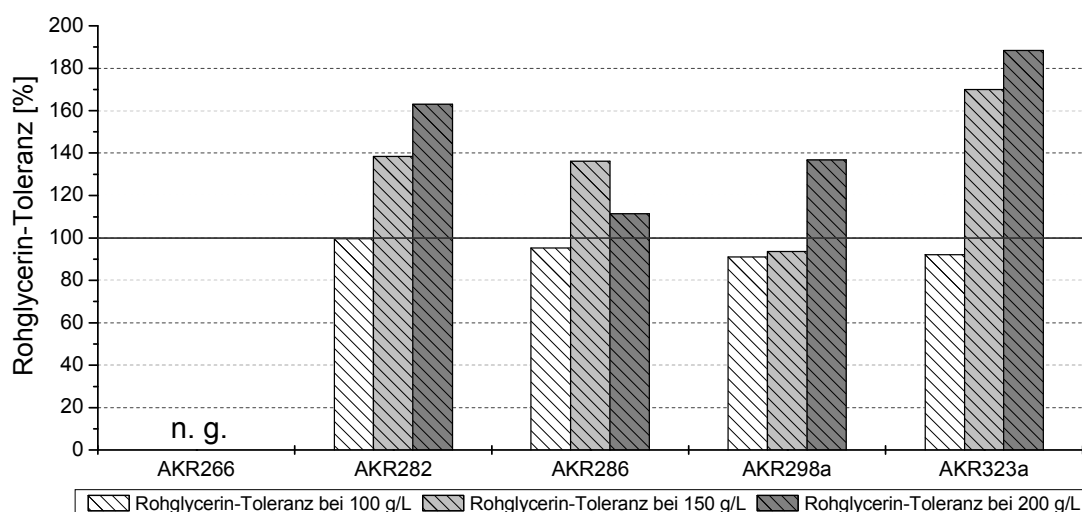


Abbildung 4.37: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz der Stämme AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a nach Gleichung 4.1 nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L, 150 g/L und 200 g/L Rohglycerin (Charge 2) bzw. Pharmaglycerin, 30 g/L CaCO₃, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte, n. g.: nicht getestet

Bei Einsatz des Rohglycerins der Charge 2 werden prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie bei Einsatz der Charge 3 beobachtet. Es fällt jedoch auf, dass die Toleranzwerte noch erheblich gesteigert werden konnten. So bildet AKR282 bei Einsatz von 200 g/L Glycerin 163 % des 1,3-Propandiols, dass mit Pharmaglycerin gebildet wurde (146 % mit Charge 3), AKR323a erreicht hier sogar 188 % (156 % mit Charge 3).

Demnach ist die gesteigerte Rohglycerin-Toleranz der Reinkulturen im Screening 4 auf die Stammeigenschaften der Isolate zurückzuführen und nicht auf die Veränderte Zusammensetzung des Rohglycerins.

Im Screening-Durchgang 4 wurden in der Anreicherungsphase ein Gemisch von Ersatzstoffen für Hefeextrakt eingesetzt (vgl. Kapitel 4.3.4, Tabelle 4.21).

Als nächstes wurde untersucht, wie hoch der Bedarf der isolierten Stämme an Hefeextrakt ist, ob ein Ersatz durch definierte Vitaminlösung möglich ist und ob die Stämme die einzelnen oder ein Gemisch der Ersatzstoffe verwerten können.

Es sollte nun überprüft werden, inwiefern die isolierten Stämme durch verringerte Zugabe an Supplinen in ihrer Produktionskapazität eingeschränkt werden. Hierzu wurde der Umsatz von 100 g/L Pharmaglycerin mit normaler Zugabe an Hefeextrakt (2 g/L) mit dem bei 1/10 des Hefeextraktes (0,2 g/L), sowie mit Vitaminlösung verglichen (vgl. Abbildung 4.24)

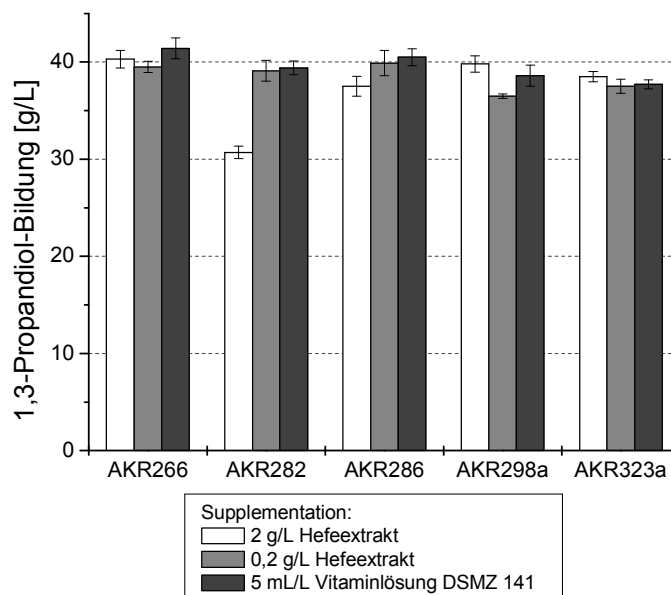


Abbildung 4.38: Evaluierung des Supplin-Bedarfes der Stämme AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a - 1,3-Propanediol-Bildung nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 bzw. 0,2 g/L Hefeextrakt, 5 mL/L Vitaminlösung DSMZ 141; 30 g/L CaCO₃, 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 300 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Die Stämme zeigen einen niedrigen Bedarf an Supplementation. Sowohl eine Verringerung des Hefeextraktes als auch der Ersatz durch Vitaminlösung sind problemlos möglich, ohne, dass ein negativer Effekt auf die 1,3-Propanediol-Endkonzentration zu verzeichnen ist. Die Abweichungen liegen für alle Stämme unterhalb von 10 %. Der Stamm AKR282 bildet bei verringerter Supplementation sogar 26 % mehr Produkt. Wong et al. (2011) haben diesen Effekt bei Verringerung der Nährstoffe auf ein zwanzigstel für den Stamm *Klebsiella spezie* HE-2 im pH-geregelten Batch-Versuch ebenfalls beobachten. Bei hohem Nährstoffangebot zeigte der Stamm gutes Wachstum und bildete Ethanol als Hauptprodukt. Die Überführung

der Zellen in Medium mit verringerter Nähstoffzugabe führte dazu, dass kein Wachstum mehr stattfand, jedoch wurde 1,3-Propandiol als Hauptprodukt gebildet. Die Autoren führten dies darauf zurück, dass Wachstum und 1,3-Propandiol-Bildung hier in Konkurrenz standen. Der Einsatz in einem Fermentationsprozess mit geringem Einsatz an Hefeextrakt ist für alle getesteten Stämme möglich. Interessant wäre auch eine nähere Untersuchung, welche Vitamine, die in der Lösung angeboten wurden, tatsächlich Wachstum und Produktbildung beeinflussen. So könnte ein Prozess mit definiertem Medium entwickelt werden. Ob dies eine wirtschaftliche Alternative ist, ist jedoch stark abhängig von den benötigten Vitaminen.

In der Anreicherung des Screenings waren pflanzliche Ersatzstoffe für Hefeextrakt zum Einsatz gekommen. Die Stämme wurden aus Kompost- und Gewässersedimentproben isoliert, Standorte an denen pflanzliche Substrate in großer Menge vorkommen. Es ist somit zu erwarten, dass die angereicherten und isolierten Stämme an die Nutzung pflanzlicher Nährstoffquellen adaptiert sind. Die Stämme wurden daher auf ihre Produktbildung bei Einsatz der in der Anreicherung angewendeten Ersatzstoffe für Hefeextrakt getestet. 2 g/L der einzelnen Ersatzstoffe (Sojaproteinkonzentrat, Kartoffelprotein, Weizenkleber, Maiskleber) bzw. eine Mischung der Substanzen (je 0,5 g/L) wurden für die Umsetzung von 100 g/L Pharmaglycerin eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.39 dargestellt, als Referenz wird der Ansatz mit der Standard-Konzentration an Hefeextrakt abgebildet.

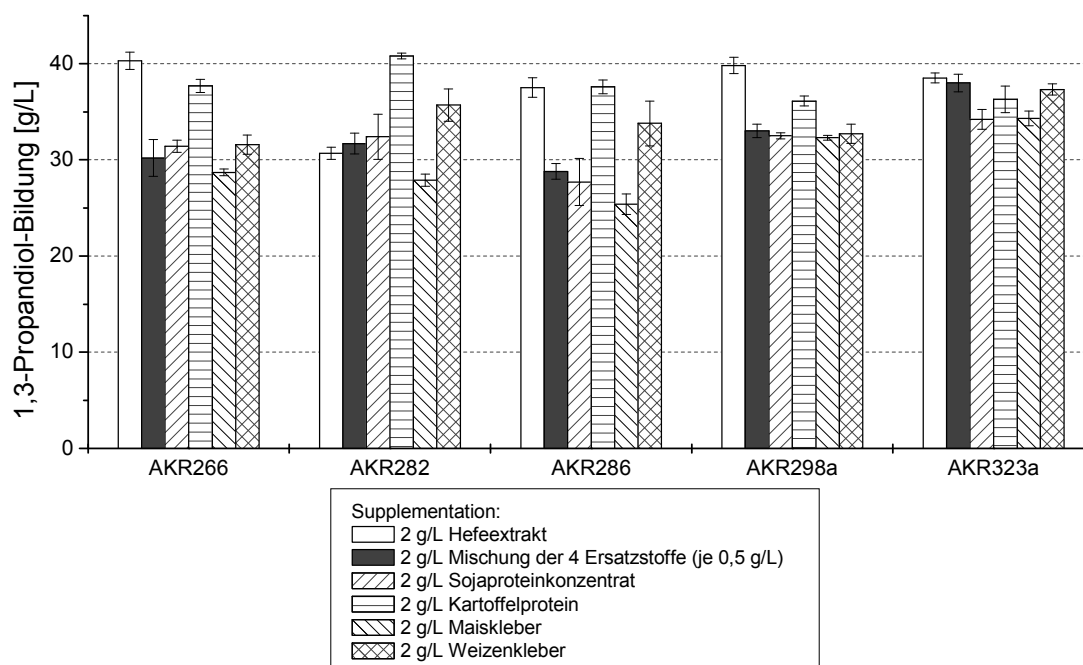


Abbildung 4.39: Evaluierung des Supplin-Bedarfes von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a - 1,3-Propandiol-Bildung nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 g/L des Hefeextrakt-Ersatzstoffes (Sojaproteinkonzentrat, Kartoffelprotein, Maiskleber, Weizenkleber) bzw. Mischung der Ersatzstoffe (Summe 2 g/L); 30 g/L CaCO_3 , 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 300 upm); rechnerisch korrigierte Werte

Die getesteten Stämme zeigten Wachstum und Produktbildung mit allen eingesetzten Ersatzstoffen. Der Stamm AKR323a erreichte bei allen eingesetzten Ersatzstoffen nahezu den Referenzwert (2 g/L Hefeextrakt) von 38,5 g/L, die größte Abweichung betrug 11%. ARK282 zeigte, wie zuvor schon bei verringerter Hefeextrakt-Konzentration, bessere Werte bei Einsatz der Ersatzstoffe. Besonders der Einsatz von Weizenkleber und Kartoffelprotein erbrachten einen Konzentrationszuwachs von 13 bzw. 33 %.

Auch für AKR266, AKR286 und AKR298a waren die Abweichungen zum Referenzwert bei der Umsetzung mit Kartoffelprotein nur gering. Mit den anderen Ersatzstoffen bildeten die Isolate im Vergleich zur Referenz verringerte 1,3-Propandiol-Mengen (AKR266 21 - 28 %, AKR286 10 – 32 % und AKR298a 18 – 19 %). Auch eine Mischung der Ersatzstoffe führte hier nicht zur Verbesserung der Produktion.

Der Einsatz von Ersatzstoffen für Hefeextrakt als kostengünstige Alternative kann die Rohstoffkosten einer Fermentation senken und so die Wirtschaftlichkeit erhöhen (Willke und Vorlop, 2008). Für den Ersatz des Hefeextrakts bietet sich bei den hier untersuchten Stämmen Kartoffelprotein an. Dieser Ersatzstoff konnte von allen Stämmen genutzt werden bei niedrigen bis keinen Produkteinbußen. Es ist zu erwarten, dass eine Optimierung der eingesetzten Menge, besonders bei Einsatz im Bioreaktor, die Umsetzung noch verbessern wird.

Die Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der Stämme AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a sind in Tabelle 4.33 zusammengefasst:

Tabelle 4.33: Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des Screening-Verfahrens 4

Stamm	1,3-PD Toleranz	Edukt-Toleranz	RG-Toleranz (150 g/L)	1/10 Hefeextrakt	Vitaminlösung DSMZ 141	Hefeextrakt-Ersatzstoffe (Mittelwert)	Einstufung
AKR266	+++	+++	+	+++	++++	+	geeignet
AKR282	+++	+++	++++	++++	++++	++++	sehr geeignet
AKR286	+++	+++	++++	++++	++++	++	sehr geeignet
AKR298a	+++	+++	+	+++	+++	++	geeignet
AKR323a	+++	+++	++++	+++	+++	+++	sehr geeignet

-: schlecht; +: gut; ++: sehr gut; +++: hervorragend; ++++ fördernd

1,3-Propandiol-Toleranz Endkonzentration bei 1,3-PD-Vorlage: - < 80 g/L, + ≥ 80 g/L; ++ ≥ 90 g/L; +++ ≥ 100 g/L

Edukt-Toleranz – 1,3-PD-Bildung bei Glycerin-Vorlage von: - < 100 g/L; + 100 g/L; ++ 150 g/L; +++ 200 g/L

Rohglycerin-Toleranz, 1/10 Hefeextrakt, Vitaminlösung, Hefeextrakt-Ersatzstoffe:

- < 70 %; + ≥ 70 %; ++ ≥ 80 %; +++ ≥ 90 %; ++++ ≥ 100 %

Alle Stämme des vierten Screening-Durchgangs demonstrieren gute bis hervorragende Stammeigenschaften. AKR266 zeigt jedoch Defizite bei der Nutzung von Rohglycerin und der meisten getesteten Hefeextrakt-Ersatzstoffe. AKR298a ist ebenfalls durch Rohglycerin gehemmt und zeigt in allen Versuchen, bei denen die Hefeextrakt-Konzentration verringert wurde, eine verringerte Produktbildung. AKR282, AKR286 und AKR232a haben in allen Kategorien sehr gute bis hervorragende Ergebnisse, zudem erreichte AKR286 in der Evaluierung

rung der 1,3-Propandiol-Toleranz mit 111 g/L die höchste Endkonzentration. Diese Stämme sind somit für eine Evaluierung im pH-geregelten Bioreaktor besonders zu empfehlen.

4.5.4 Zusammenfassung – Evaluierung der Reinkulturen

Die Aufgabe der hier durchgeführten Screening-Verfahren war es, potenzielle Produktionsstämme für einen wirtschaftlichen Fermentationsprozess für die 1,3-Propandiol-Produktion aus Rohglycerin zu isolieren. Die in den drei Screening-Durchgängen angestrebten Stammeigenschaften waren demnach 1,3-Propandiol-Toleranz, Rohglycerin-Verwertung und z. T. ein geringer Bedarf an Hefeextrakt bzw. Nutzung von Ersatzstoffen.

Die Evaluierung der isolierten Reinkulturen hatte zum Ziel, deren Produktionseigenschaften einzuschätzen und eine Empfehlung für eine weitere Evaluierung im pH-geregelten Bioreaktor zu geben. Durch die Verkleinerung des Maßstabes und die Optimierung der pH-Pufferung konnten Probendurchsatz und erreichbare Produktendkonzentrationen gesteigert werden (vgl. Kapitel 4.2). Dies ermöglichte eine parallele, statistisch abgesicherte Evaluierung aller Reinkulturen eines Screening-Durchganges hinsichtlich der angestrebten Stammeigenschaften. Es wurden insgesamt 27 Reinkulturen aus drei Screening-Durchgängen evaluiert.

Die 1,3-Propandiol-Toleranz wurde als Hauptauswahlkriterium für einen Produktionsstamm verwendet und daher im ersten Schritt evaluiert. Die Reinkulturen wurden auf 1,3-Propandiol-Bildung bei Vorlage des Produktes getestet. Die Höhe der Vorlage war von der Selektivität während der Anreicherung und der Kolonie-Evaluierung des entsprechenden Screening-Durchganges abhängig und wurde somit entsprechend erhöht. Die 1,3-Propandiol-Startkonzentrationen lagen im Bereich von 30 bis 100 g/L. Insgesamt Zehn Reinkulturen aus den drei Screening-Durchgängen wurden auf Grund einer positiven Bewertung ihrer 1,3-Propandiol-Toleranz für eine weitere Evaluierung ausgewählt. Zwei Stämme erreichten 1,3-Propandiol-Konzentrationen von über 80 g/L 1,3-Propandiol (Vorlage von 60 g/L), zwei Stämme erreichten über 90 g/L (Vorlage 90 g/L) und sechs Stämme erreichten über 100 g/L 1,3-Propandiol (Vorlage 77 bzw. 100 g/L).

Weitere Evaluierungskriterien waren eine hohe Edukt-Toleranz für einen Einsatz im pH-geregelten Batch- bzw. repeated Batch-Prozess und Rohglycerin-Toleranz. Diese Eigenschaften wurden über die Produktbildung bei Vorlage von Substrat-Konzentrationen im Bereich von 100 bis 200 g/L ermittelt. Die Rohglycerin-Toleranz wurde eingeschätzt, indem die 1,3-Propandiol-Bildung mit dem im Screening eingesetzten Rohglycerin (vgl. Kapitel 3.1.4) auf die bei Einsatz von Pharmaglycerin bezogen wurde.

Alle evaluierten Isolate waren in der Lage 1,3-Propandiol mit 150 g/L Pharmaglycerin zu bilden. Sieben Reinkulturen bildeten auch mit 200 g/L Pharmaglycerin noch Produkt. Die Ergebnisse mit Rohglycerin waren, mit Ausnahme eines Stammes, ähnlich. Zur Beurteilung der Rohglycerin-Toleranz wurden die Ergebnisse bei Einsatz von 150 g/L Substrat herangezogen.

gen. Hier kam es bei einem Stamm zu kompletter Hemmung der Produktbildung, vier Stämme wiesen eine Rohglycerin-Toleranz im Bereich von 70 bis 100 % auf. Für die anderen fünf getesteten Stämme wirkte der Einsatz von Rohglycerin sich förderlich auf die Produktbildung aus, so dass die bestimmten Toleranzwerte z. T. weit über 100 % lagen.

Schließlich wurde der Bedarf der Isolate an Hefeextrakt untersucht. Der Einsatz von hohen Mengen an Hefeextrakt trägt erheblich zu den Rohstoffkosten einer Fermentation bei. Daher werden Stämme bevorzugt, die bei Einsatz geringer Mengen an Hefeextrakt bzw. der Ersatzstoffe vergleichbare 1,3-Propandiol-Bildung aufwiesen wie unter Standardbedingungen. Die genauen Evaluierungs-Versuche waren von der verwendeten Nährstoffquelle in der Anreicherungsphase der unterschiedlichen Screening-Durchgänge abhängig.

Alle Stämme wurden jedoch bei einer auf ein Zehntel verringerten Hefeextrakt Konzentration im Vergleich zur Referenz (100 g/L Pharmaglycerin, 2 g/L) getestet. Während ein Stamm kaum Produktbildung zeigte, erreichten sieben Stämme 70 bis 100 % der 1,3-Propandiol-Konzentration die mit der Referenz erreicht wurde. Bei zwei Stämmen wurde die Produktbildung durch Verringerung des Hefeextraktes sogar begünstigt.

Sieben der Stämme wurden außerdem auf die Verwertung von Vitaminlösung als Ersatz für Hefeextrakt getestet. Durch Aufklärung des Vitaminbedarfes besteht die Möglichkeit ein definiertes Medium für einen Fermentationsprozess zu entwickeln. Alle getesteten Stämme bildeten 1,3-Propandiol mit der eingesetzten Vitaminlösung als Supplin-Quelle. Vier Stämme bildeten 80 bis 100 % des 1,3-Propandiols der Referenzkultivierung, drei Stämme bildeten bei Einsatz von Vitaminlösung vermehrt Produkt.

Im vierten Screening-Durchgang wurde in der Anreicherungsphase ein Gemisch pflanzlicher Tierfuttermittel als Ersatz für den Hefeextrakt eingesetzt. Diese Ersatzstoffe, Sojaproteinkonzentrat, Kartoffelprotein, Weizenkleber und Maiskleber, könnten in einem Fermentationsprozess als kostengünstige Alternative zum Hefeextrakt eingesetzt werden. Vier der fünf Stämme des vierten Screening-Durchgangs bildeten mit den Ersatzstoffen im Mittel ca. 80 bis 100 % des Referenzwertes an 1,3-Propandiol. Ein Stamm erreichte mit den meisten Ersatzstoffen höhere Produktkonzentrationen als in der Referenz. Fast alle Stämme zeigten jedoch mit Kartoffelprotein die besten Ergebnisse. Eine genauere Untersuchung für dessen Einsatz in einem Fermentationsprozess muss geprüft werden.

Die besten Reinkulturen aus jedem Screening wurden für eine Evaluierung im pH-geregelten Bioreaktor vorgeschlagen. Von den insgesamt 27 Reinkulturen wurden neun Stämme ausgewählt. Für Screening 2 waren dies AKR91b und AKR102a, für Screening 3 AKR249b und AKR263 und für Screening 4 wurden ARK266, AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a. Eine genaue Charakterisierung und Identifizierung muss nun die Sicherheitseinstufung der Stämme klären. Der Stamm AKR92a wurde ebenfalls identifiziert, da er auf Grund seiner hohen 1,3-Propandiol-Toleranz ebenfalls im pH-geregelten Bioreaktor getestet wurde.

4.6 Identifizierung der potenziellen Produktionsstämme

Die Reinkulturen, die in der Evaluierung auf Grund ihrer positiven Produktionseigenschaften ausgewählt wurden, werden nun näher charakterisiert und identifiziert. Einerseits ist für einen industriellen Prozess eine Einstufung des Gefährdungspotentials der Mikroorganismen für Mensch und Umwelt, die Einordnung in die Risikogruppen 1 bis 4, notwendig (vgl. Kapitel 2.1.6.3). Andererseits können durch die Identifizierung Rückschlüsse auf die optimalen Kultivierungsbedingungen für einen Mikroorganismus geschlossen werden (vgl. Kapitel 2.3.3). Aus dem ersten Screening wurde AKR17a gewählt, da dieser Stamm in der Fermentationsoptimierung (Wilkens, 2012) zum Einsatz kam. Eine vorläufige Einordnung der Mikroorganismen erfolgt zunächst über phänotypische und biochemische Merkmale.

Mikroskopische Untersuchungen der Stämme wurden durchgeführt zur Aufklärung der Zellmorphologie und zum Nachweis der Endosporen-Bildung. Das Wachstum auf Festmedium wurde unter anaeroben und aeroben Bedingungen überprüft, um den Einfluss von Sauerstoff auf die Stämme einzuschätzen. Zur weiteren Charakterisierung der potenziellen Produktionsstämme wurde auf die Anwesenheit der L-Alanin-Aminopeptidase getestet, die fast ausschließlich in Gram-negativen Mikroorganismen vorkommt (vgl. Kapitel 3.4.2). Verliefe der Test negativ, wurde der Organismus als Gram-positiv eingestuft. Ein positiver Nachweis der L-Alanin-Aminopeptidase führte zur Einordnung eines Stammes als Gram-negativ.

Gram-negativ eingestufte Stämme wurden auf die Anwesenheit der Cytochromoxidase getestet, da Enterobakterien sich durch das Fehlen dieses Enzyms von anderen Gram-negativen Mikroorganismen abgrenzen (vgl. Kapitel 3.4.3). Ebenso wurde das Wachstum auf MacConkey-Agar getestet, ein differenzierender Nähragar für die Kultivierung von Lactose-verwertenden Enterobakterien (vgl. Kapitel 3.4.4). Die Ergebnisse der Voruntersuchungen sind in Tabelle 4.34 zusammengefasst. Auf diesen Ergebnissen basierte das weitere Vorgehen bei der Identifizierung der Reinkulturen.

AKR249, AKR263, AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a waren Gram-negative, fakultativ anaerobe Stämme, die keine Sporenbildung und Cytochromoxidase Aktivität aufwiesen. Sie wurden der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet (vgl. Kapitel 2.3.3.2). Diese wurden mittels des BD BBL Enterotube II Testsystems gemäß Kapitel 3.4.5 identifiziert. Die Ergebnisse der 15 biochemischen Reaktionen, die in diesem Testsystem untersucht werden, sind in Tabelle 4.36 dargestellt. Nach Herstellerangaben werden die ausgewerteten Reaktionen in einen Identifikationscode umgewandelt, die Zuordnung des Codes zu einer Spezies erfolgt mit Hilfe eines Code-Buches (vgl. Kapitel 2.1.6.1).

Die Reinkulturen AKR249b und AKR263 aus Screening-Durchgang 3 wurden so als *Citrobacter freundii* identifiziert. Der Code, der für die Isolate ermittelt wurde, ist identisch und beide Stämme wurden aus derselben Umweltprobe isoliert. Die in der Stammevaluierung

ermittelten Produktionseigenschaften waren jedoch z. T. sehr unterschiedlich (vgl. Kapitel 4.5.2), so dass es sich hier nicht um denselben Mikroorganismus handelt.

Die Resultate für AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a, die aus Screening 3 stammen, ergaben verschiedene Identifizierungscodes. Die Stämme AKR266, AKR286 und AKR323a hatten den gleichen Code. AKR266 und AKR286 stammten auch aus derselben Anreicherungskultur (Gewässersediment) und verhielten sich in der Evaluierung, mit Ausnahme der Rohglycerin-Toleranz, sehr ähnlich. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass es sich um denselben Mikroorganismus handelt. Der Stamm AKR323a, der ebenfalls den identischen Code aufwies, stammte aus der Anreicherungskultur, die mit Kompostproben beimpft war und ist somit nicht identisch mit den anderen zwei Stämmen. Die Ergebnisse der Stämme AKR282 und AKR298a ergaben zwei weitere Identifikationscodes. Die drei unterschiedlichen Codes ergeben jedoch alle eine Zuordnung zur Spezies *K. pneumoniae*.

AKR17a, AKR91b, AKR92a und AKR102a waren Gram-positive, strikt anaerob und bildeten Endosporen. Sie wurden somit den Clostridien zugeordnet (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Die Zugehörigkeit zu den bekannten 1,3-Propandiol-bildenden Arten *C. butyricum* bzw. *C. diolis* wurde zunächst über eine stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Stämme im Vergleich zu den Typstämmen bzw. Literaturwerten vorgenommen. Es wurde ein Test auf Substratverwertung mit der Methode nach Holdeman und Moore (1977) eingesetzt. Die Verwertung von 18 Substraten sowie Medium ohne zugesetztes Substrat als Negativkontrolle wurden im DWP-Maßstab getestet (vgl. Kapitel 3.4.6). Jedes der 19 Medien wurde pro Stamm im Dreifachansatz untersucht. Die anaerobe Inkubation erfolgte für 3 d ungeschüttelt bei 32 °C. Die Verwertung der Substrate wurde über die Bestimmung der pH-Wert-Absenkung im zellfreien Überstand unter Berücksichtigung der pH-Wert-Absenkung in der Negativkontrolle nachgewiesen (vgl. Gleichung 3.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.36 zusammengefasst.

Der Typstamm der Spezies *C. butyricum*, sowie der Referenzstamm *C. butyricum* NRRL 1024 zeigten dasselbe Verwertungsmuster. Dieses stimmte sehr gut mit den Ergebnissen überein, die Holdeman und Moore (1977), für die Mehrzahl der *C. butyricum* Stämme ermittelt haben. AKR17a, AKR91b, AKR92a und AKR102a zeigten in ihren Reaktionen nahezu vollständige Übereinstimmung mit den Referenzstämmen der Spezies *C. butyricum* und den Literaturwerten. Diese Stämme wurden daher *C. butyricum* zugeordnet. Ein Vergleich mit *C. diolis* DSMZ 15410 zeigte, dass dieser Stamm sich in seinen Reaktionen von *C. butyricum* und den Isolaten unterschied. Insgesamt vier Reaktionen (Melibiose, Ribose, Mannitol und Sorbitol) wichen von denen des Typstammes *C. butyricum* ab. Biebl et al. (2002) hatten *C. diolis* DSMZ 15410, ehemals als *C. butyricum* DSMZ 5431 bezeichnet, auf Grund der geringen DNA-DNA-Hybridisierung sowie physiologischer Unterschiede zu *C. butyricum* und *C. beijerinckii* als Typstamm der neuen Spezies *C. diolis* definiert.

Tabelle 4.34: Charakterisierung der für eine Fermentationsoptimierung ausgewählten Reinkulturen der Screening-Durchgänge 1 bis 4 (links)

Tabelle 4.35: Identifizierung der Gram-negativen Reinkulturen der Screening-Durchgänge 3 und 4 mittels BD BBL Enterotube II (rechts)

Stammeigenschaft	Screening 1	Screening 2		Screening 3		Screening 4					
	AKR17a	AKR91b	AKR92a	AKR102a	AKR249b	AKR263	AKR266	AKR282	AKR286	AKR298a	AKR323a
Zell-Morphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen
Sauerstoff-Bedarf	strikt anaerob	strikt anaerob	strikt anaerob	strikt anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob
Sporen-Bildung	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Alanin-Amino-peptidase Test	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Gram-Färbung	+	+	+	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Oxidase Test	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	-	-	-	-	-	-	-
Wachstum / Koloniefarbe MacConkey	n.g.	n.g..	n.g.	n.g.	+ / rötlich	+ / rötlich	+ / rot	+ / rot	+ / rot	+ / rot	+ / rötlich
Vorläufige Zuordnung	Clostridium	Clostridium	Clostridium	Clostridium	Enterobakterium	Enterobakterium	Enterobakterium	Enterobakterium	Enterobakterium	Enterobakterium	Enterobakterium

n.g. nicht getestet; + positiv; - negativ

Nr.	Test	Screening 3		Screening 4		AKR286	AKR298a	AKR323a
		AKR249b	AKR263	AKR266	AKR282			
1	Säurebildung aus Glucose	+	+	+	+	+	+	+
2	Gasbildung aus Glucose	+	+	+	+	+	+	+
3	Decarboxylierung von Lysin	-	-	+	+	+	+	+
4	Decarboxylierung von Ornithin	+	+	-	-	-	-	-
5	Schwefelwasserstoffproduktion	+	+	-	-	-	-	-
6	Indol-Bildung aus Tryptophan	-	-	-	-	-	-	-
7	Fermentation von Adonit	-	-	+	+	+	+	+
8	Fermentation von Lactose	+	+	+	+	+	+	+
9	Fermentation von Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
10	Fermentation von Sorbit	+	+	+	+	+	+	+
11	Acetoin aus Glucose	-	-	+	+	+	+	+
12	Fermentation von Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+
13	Desaminierung von Phenylalanin	-	-	-	-	-	-	-
14	Hydrolyse von Harnstoff	-	-	+	+	+	+	+
15	Citratverwertung	-	-	+	+	+	+	+
ID-Blockcode		66350	66350	70773	70363	70773	70763	70773

Tabelle 4.36: Stoffwechselphysiologische Identifizierung der Gram-positiven Reinkulturen – Test auf Substratverwertung durch die Isolate des Screening-Durchgänge 1 und 2, sowie den Typ-Stämmen *C. butyricum* DSMZ 10702 und *C. diolis* DSMZ 15410

Stammherkunft	Referenz Literatur <i>Clostridium butyricum</i> *	Referenzstamm <i>C. butyricum</i> ^{TS} DSMZ 10702	Referenzstamm <i>C. butyricum</i> NRRL 1024	Screening 1 ARK17a	Screening 2 AKR91b	Screening 2 AKR92a	AKR102a	Referenzstamm <i>C. diolis</i> ^{TS} DSMZ 15410
PY Medium	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Amygdalin	+/-	+	+	+	+	+	+	+
PY Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Esculin	+/-	+	+	+	+	(+)	+	+
PY Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Mannitol	-/+	-	-	-	-	-	-	+
PY Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+
PY Arabinose	+/-	+	+	+	+	+	+	+
PY Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+
PY Melezitose	-/+	-	-	-	-	-	-	-
PY m-Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
PY m-Inositol	-	-	-	(+)	-	-	-	-
Identifizierung		<i>C. butyricum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. butyricum</i>	Keine Zuordnung

*nach Holdeman and Moore, (1977) (Anaerobe Laboratory Manual);

TS: Typstamm der Spezies

- negativ; (+) schwach positiv; + positiv; +/- die meisten Stämme positiv; -/+ die meisten Stämme negativ;

- < 0,25; (+) ≥ 0,25; + ≥ 0,5 pH-Wert-Absenkung

Ein wesentliches Kriterium für die Auswahl eines industriellen Produktionsstammes ist die Pathogenität. Die Sicherheitsanforderungen an eine Produktionsanlage für einen nicht pathogenen Stamm sind gering (vgl. Kapitel 2.1.6.3). Die Identifizierung der potenziellen Produktionsstämme ermöglicht nun die Sicherheitseinstufung in die vier Risikogruppen der technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466). Nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit ist eine Neufassung dieses Regelwerkes erschienen. Dies führte zur Neueinordnung einiger Isolate. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.37 zusammengefasst.

Tabelle 4.37: Sicherheitseinstufung der isolierten Produktionsstämme der Screening-Durchgänge 1 bis 4 nach TRBA 466

Screening-Durchgang	Stamm-bezeichnung	Identifizierung	Einstufung der Risikogruppe nach	
			TRBA 466 Stand Dezember 2005	TRBA 466 Stand Dezember 2010
1	AKR17a	<i>C. butyricum</i>	1	2
2	AKR91b	<i>C. butyricum</i>	1	2
	AKR92a	<i>C. butyricum</i>	1	2
	AKR102a	<i>C. butyricum</i>	1	2
3	AKR249b	<i>C. freundii</i>	2	2
	AKR263	<i>C. freundii</i>	2	2
4	AKR266	<i>K. pneumoniae</i>	2	2
	AKR282	<i>K. pneumoniae</i>	2	2
	AKR286	<i>K. pneumoniae</i>	2	2
	AKR298a	<i>K. pneumoniae</i>	2	2
	AKR323a	<i>K. pneumoniae</i>	2	2

Zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten zu Screening und Fermentationsoptimierung (Wilkens, 2012) waren vier Stämme, AKR17a, AKR91b, AKR92a und AKR102a, der Risikogruppe 1 zu zuordnen und somit für einen industriellen Prozess geeignet. Sie wurden somit für eine Fermentationsoptimierung vorgeschlagen. Im Rahmen der Neuauflage der TRBA 466 wurde *C. butyricum* neu eingeordnet als Risikogruppe 2, da einige Vertreter dieser Art als Botulismus Erreger identifiziert wurden (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Es ist zu prüfen, ob bei Nachweis, dass die genetischen Voraussetzungen für die Bildung des Botulinum Toxins nicht vorhanden sind, eine Herabstufung der Risikogruppe möglich ist.

Die vier Stämme, die auf Grund ihrer Sicherheitseinstufung ausgewählt wurden, wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) auf Basis der 16S rDNA identifiziert (vgl. Kapitel 3.4.7). Dies ermöglicht eine Zuordnung der Isolate zu der 1,3-Propandiol-produzierenden Art *C. butyricum* bzw. der Art *C. diolis*, die noch immer zur Risikogruppe 1 gehört, oder zu einer anderen Clostridien-Art. Die Ergebnisse der 16S rDNA Analyse für AKR17a sind in Tabelle 4.38 und die für AKR91b, AKR92a und AKR102a in Tabelle 4.39 dargestellt.

Tabelle 4.38: Identifizierung des Stammes AKR17a (Screening 1) mittels 16S rDNA-Analyse

Stamm	% Ähnlichkeit der 16S rRNA Gensequenz zu AKR17a
<i>Clostridium butyricum</i> VPI 3266	100
<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 5430	100
<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 ^{1S}	99,8
<i>Clostridium beijerinckii</i> DSMZ 791 ^{TS}	98,6
<i>Clostridium saccharobutylicum</i> DSMZ 13864 ^{1S}	98,2

TS: Typstamm der Spezies

Tabelle 4.39: Identifizierung der Stämme AKR91b, AKR92a und AKR102a (Screening 2) mittels 16S rDNA-Analyse

Stamm	% Ähnlichkeit der 16S rRNA Gensequenz zu AKR91b
AKR92a	100,0
AKR102a	100,0
<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 ^{1S}	99,7
<i>Clostridium beijerinckii</i> DSMZ 791 ^{TS}	99,2
<i>Clostridium saccharobutylicum</i> DSMZ 13864 ^{1S}	98,4

TS: Typstamm der Spezies

Der Stamm AKR17a aus Screening 1 zeigte eine Übereinstimmung in der 16S rDNA Sequenz von 100 % zu verschiedenen in der Literatur beschriebenen 1,3-Propandiol-Produzenten der Spezies *C. butyricum* (Biebl et al., 1992; Gonzalez-Pajuelo et al., 2004).

Für die drei Stämme AKR91b, AKR92a und AKR102a aus Screening 2 wurde eine identische 16S rDNA-Sequenz ermittelt. Während AKR91b und AKR92a aus derselben mit Probe 2 (vgl. Tabelle 4.11) beimpften Anreicherungskultur stammen, wurde AKR102a aus einer Anreicherung isoliert, die mit Probe 1 beimpft war. Trotz Zuordnung zu derselben Spezies waren in der Evaluierung von AKR91b, AKR92a und AKR102a (vgl. Kapitel 4.5.1) deutlich Unterschiede bei den Produktionseigenschaften zu beobachten. Es ist somit unwahrscheinlich, dass es sich bei den drei Stämmen um denselben Mikroorganismus handelt, so dass genetische Variabilität in anderen Regionen als der 16S rDNA besteht.

Die Zuordnung zu einer Spezies wird durch die Ähnlichkeit zum Typstamm der Spezies ermittelt. Die Reinkulturen beider Screening-Durchgänge wiesen in ihrer 16S rDNA-Sequenz die größte Ähnlichkeit mit dem Typstamm von *C. butyricum* auf. Jedoch auch zu den Typstämmen der Arten *C. beijerinckii* und *C. saccharobutylicum* besteht eine Abweichung, die unter 2 % liegt. Eine Abweichung von mehr als 3 % würde die Zuordnung zu einer neuen Spezies bedeuten (vgl. Kapitel 2.1.6.2). Trotzdem ist auf Grund der vorherigen stoffwechselphysiologischen Untersuchungen die Einordnung zur Spezies *C. butyricum* zu treffen.

4.7 Vergleich und Beurteilung der Screening-Verfahren

Ein unmittelbarer Vergleich der durchgeführten Screening-Durchgänge soll nun eine Empfehlung über das generelle Vorgehen bei Screening nach 1,3-Propandiol-Produzenten geben. Ein Vergleich der vier Screening-Durchgänge ist in Tabelle 4.40 gegeben.

Im konventionellen Screening fand keine Probenvorbereitung statt. Die Vorbehandlung der Proben in Screening 2 und 3 sollte eine Vorselektion auf Sporen-bildende Mikroorganismen und den Ausschluss pathogener Enterobakterien bewirken. Während in Screening 2 ausschließlich Sporen-bildende Clostridien isoliert wurden, ergab Screening 3 trotz Trocknung und anschließender Pasteurisierung der Umweltproben (vgl. Kapitel 4.3.2) zwei Stämme des opportunistischen Pathogens *C. freundii* (vgl. Kapitel TG 1.3.3.2). Pasteurisierung tötet nur 97 bis 99 % der lebensfähigen Zellen ab (Overmann, 2006) und beide Stämme wurden aus einer Kompostprobe isoliert. Im Verlauf der Kompostierung werden z. T. hohe Temperaturen von über 60°C erreicht, so dass mesophile Pathogene zum großen Teil abgetötet werden. Nach Abkühlung nimmt der Anteil der mesophilen Bakterien jedoch wieder zu (Tuomela et al., 2000). Droffner et al. (1995) wiesen *C. freundii* in aktivem Haushaltskompost bei Temperaturen von über 60°C nach. Die Autoren schlossen daraus, dass das mesophile Bakterium Mechanismen für das Überleben bei hohen Temperaturen besitzt. Bonjoch et al. (2009) untersuchten u. a. den Einfluss von Kompostierung bei 55°C und Pasteurisierung bei 60°C (90 min) und 80°C (60 min) auf Fäkalkeime in Klärschlamm. Während sowohl Kompostierung als auch Pasteurisierung die Keimzahl um 5 bis 6 Zehnerpotenzen verringerte, wurde die Diversität der vorhandenen Arten kaum beeinflusst. Der Genus *Citrobacter* bewies hierbei die größte Resistenz gegenüber Inaktivierung.

Pasteurisieren der Proben schließt somit die Anreicherung von Enterobakterien nicht vollständig aus. Durch verringerte Keimzahlen haben jedoch Sporen-bildende Mikroorganismen einen Wachstumsvorteil. Im Screening-Durchgang 4 wurde nur einer von zwei Ansätzen pasteurisiert, wobei die Temperatur von 60 auf 80°C erhöht wurde. Ausschließlich die nicht pasteurisierten Kulturen zeigten Wachstum, so dass die Pasteurisierung bei erhöhter Temperatur erfolgreich war. Zudem lagen keine Sporen-bildenden Mikroorganismen in den Proben vor, für die unter den gegebenen Bedingungen Wachstum möglich war. Allerdings ist zu beachten, dass die Hitzeresistenz von Endosporen sehr unterschiedlich ist und z. T. nur knapp oberhalb der Hitzeresistenz der vegetativen Form liegt und Hitzebehandlung Mutationen auslösen kann, so dass die Temperatur so niedrig wie möglich gewählt werden sollte (Bast, 2001).

Tabelle 4.40: Zusammenfassung Screening 1 bis 4 - Selektionskriterien, Inokulum, der Selektivität des Anreicherungsmedien und Optimierungsschritte

Parameter	Screening 1	Screening 2	Screening 3	Screening 4
Selektionskriterien / Stammeigenschaften	- (Roh-)Glycerin-Verwertung	- Sporenbildung - Rohglycerin-Verwertung - Edukt-Toleranz - 1,3-Propandiol-Toleranz - Nebenprodukttoleranz	- Sporenbildner - Rohglycerin-Verwertung - 1,3-Propandiol-Toleranz - geringer Nährstoffbedarf	- z. T. Sporenbildner - Rohglycerin-Verwertung - 1,3-Propandiol-Toleranz - Nutzung von Ersatzstoffen für Hefeextrakt - hohe Produktivität
Umweltproben				
Anzahl der Proben	2	3	44	21
Herkunft / Probenart	Deutschland und Indonesien: - Erdprobe - Kompost	Indonesien: - Erdproben	Deutschland und Indonesien: - Erde (16) - Kompost (23) - Tiermist, Sediment, Wein (3)	Deutschland: - Kompost (6) - Gewässersediment (9) - Tiermist (7)
Probenvorbehandlung	keine	pasteurisiert	Getrocknet, gesiebt, pasteurisiert	z. T. pasteurisiert
Selektivität des Anreicherungsmediums				
Substratzusatz	- Pharmaglycerin - Rohglycerin (1. Charge)	- Rohglycerin (2. Charge)	- Rohglycerin (2. Charge)	- Rohglycerin (3. Charge)
Produktzusatz		- 1,3-Propandiol - n-Buttersäure - Essigsäure	- 1,3-Propandiol	- 1,3-Propandiol
Nährstoffzusatz	- 1 g/L Hefeextrakt	- 1 g/L Hefeextrakt	- 1/20 Hefeextrakt - Vitaminlösung DSMZ 141	- Hefeextraktersatzstoffe: Maiskleber, Weizenkleber, Kartoffelprotein, Sojaproteinkonzentrat
Anreicherungsmaßstab	Hungate-Röhrchen	Hungate-Röhrchen	DWP	Schüttelkolben
Optimierungsschritte		- Anreicherungsmedium - Kolonie-Evaluierung	- Anreicherungsmedium - Scale-down in Anreicherung	- Anreicherungsmedium - gruppierte Anreicherung - Kolonie-Evaluierung
Automatisierbare Phasen		- Kolonie-Evaluierung - Reinkultur-Evaluierung	- Anreicherungsphase (-Kolonie-Evaluierung) - Reinkultur-Evaluierung	- Kolonie-Evaluierung - Reinkultur-Evaluierung

Die Proben der unterschiedlichen Screening-Durchgänge waren zumeist Erd-, Kompost-, Sediment- und Tiermistproben. Mit Ausnahme von Screening 2 führten in allen Durchgängen Kompost-Proben zur positiven Anreicherung von 1,3-Propandiol-Produzenten. Zwar ist die Kompostierung ein aerober Prozess, jedoch existieren anaerobe Mikroumgebungen, die das Wachstum anaerober Mikroorganismen erlauben (Tuomela et al., 2000). In Screening-Durchgang 2 wurden Erdproben erfolgreich verwendet. Hier lag eine Vorselektion auf Grund der Anwesenheit von ölhaltigen Abwässern vor. In Screening 4 wurden die besten Produktionsstämme aus Sedimentproben verschiedener Gewässer (Teich, Fluss) isoliert.

Die Variation der Anreicherungsphase sollte im Wesentlichen den Durchsatz an Umweltproben und die Selektivität des Anreicherungsmediums verbessern.

Der Durchsatz an Umweltproben war im Screening 1 und 2 durch den Kultivierungsmaßstab (Hungate-Röhrchen, vgl. Abbildung 3.4) begrenzt und wurde durch die Variation der Anreicherungskultur in Screening-Durchgang 3 und 4 erhöht. Beurteilt werden die Verfahren in Bezug auf den Arbeitsaufwand, den Probendurchsatz und die Analysezeit.

In Screening 3 wurde der Durchsatz durch eine Verkleinerung des Anreicherungsmaßstabes erhöht. Es wurden standardisierte DWP eingesetzt um den Platzbedarf für die Inkubation zu verringern und die Automatisierbarkeit des Verfahrens zu ermöglichen. Der experimentelle Aufwand ist somit, besonders bei Einsatz eines Robotersystems, verringert. Der kleine Maßstab machte allerdings eine zeitaufwendige Probenaufarbeitung (vgl. Tabelle 4.40) notwendig. Bei Einsatz eines Robotersystems ist der direkte Einsatz der Proben nicht möglich, hier müssen die Mikroorganismen von den Probepartikeln abgetrennt werden. Dies geschieht z. B. durch physikochemische Behandlung mit gepufferten Lösungen, Ultraschall oder Chelat-Bildnern (Bull et al., 2000).

Die Anzahl der aktiven Anreicherungskulturen bei einem Hochdurchsatz-Screening wird durch die Selektivität des Mediums beeinflusst (vgl. Kapitel 4.3.2), so dass die Anzahl der zu analysierenden Anreicherungskulturen gering gehalten werden kann. Trotzdem besteht potenziell die Gefahr, dass die Analysedauer zeitlimitierend wird.

Im Screening-Durchgang 4 wurde der Durchsatz an Umweltproben durch die Anreicherung von Gruppen dieser Proben in einer Anreicherungskultur erreicht (vgl. Kapitel 4.3.4). In einer Batch-Anreicherungskultur haben schnell wachsende und an die Kultivierungsbedingungen am besten angepasste Mikroorganismen Vorteile (vgl. Kapitel 2.1.4). Langsam wachsende Mikroorganismen werden verdrängt. In diesem Screening-Durchgang war hohe Produktivität ein Selektionskriterium (vgl. Tabelle 4.40), die Benachteiligung eines interessanten Produktionsstammes durch die gruppierte Anreicherung ist daher nicht wahrscheinlich. Die gruppierte Anreicherung ist nicht unmittelbar automatisierbar. Jedoch ist der Arbeits- und Material- und Kostenaufwand auf Grund der verringerten Anzahl an Kulturen und der einfachen Art der Inkubation gering. Da von der insgesamt geringeren Anzahl an Anreicherungskulturen nur

diejenigen analysiert werden müssen, die metabolische Aktivität zeigen (hier zwei von sechs Anreicherungskulturen), ist die Analysezeit ebenfalls gering. Allerdings ist, abhängig von der Anzahl von Umweltproben pro Anreicherungskultur und der vorhandenen anaeroben Inkubationskapazität, die Anzahl der gleichzeitig zu bearbeitenden Umweltproben begrenzt. Für ein industrielles Hochdurchsatz Screening ist die gruppierte Anreicherungskultur somit nicht geeignet. Sie ist jedoch eine sehr gute Alternative zum Scale-down, wenn kein Robotersystem zur Verfügung steht. Bei manueller Bearbeitung können hier eine vergleichbare Anzahl an Umweltproben bei erheblich verringertem experimentellen Aufwand und kürzerer Analysezeit bewältigt werden.

Im konventionellen Screening 1 war das Anreicherungsmedium selektiv für Glycerin-verwertende Mikroorganismen, jedoch nicht für 1,3-Propandiol-Produzenten. Die Selektivität des Mediums wurde in Screening 2 bis 4 erhöht. Die Selektionskriterien Produkt-Toleranz, Rohglycerin-Verwertung und geringer Nährstoff-Bedarf wurden durch die Zusammensetzung des Anreicherungsmediums umgesetzt. Die Vorgabe an 1,3-Propandiol und Rohglycerin diente zur Hemmung von Glycerin-Verwertern, die keine Toleranz gegenüber diesen Substanzen hatten. 1,3-Propandiol wurde in Konzentrationen eingesetzt, die ein Produktionsstamm mindestens erreichen muss, die jedoch gleichzeitig noch zu Wachstum und Produktbildung in einer Anreicherungskultur führt. 1,3-Propandiol-Konzentration von 60 bis 80 g/L ermöglichten in allen Screening-Durchgängen Wachstum und Produktbildung in der Anreicherungsphase. Rohglycerin wurde im Bereich von 15 bis 60 g/L eingesetzt, wobei die Konzentration in späteren Durchgängen erhöht wurde. In Screening 4 wurden jeweils 60 g/L 1,3-Propandiol und Rohglycerin eingesetzt, hier war auf Grund hoher Edukt-Konzentration und der Calciumcarbonat pH-Pufferung die Bildung von bis zu 30 g/L 1,3-Propandiol und so Endkonzentrationen von über 90 g/L möglich (vgl. Kapitel 4.3.4).

Die Anreicherungsmedien der Screening-Verfahren 2 bis 4 unterschieden sich in der zugegebenen Supplin-Quelle (vgl. Tabelle 4.40). Es wurden verschiedene Konzentrationen an Hefeextrakt bzw. Ersatzstoffe wie Vitaminlösung oder pflanzliche Tierfuttermittel hierfür eingesetzt, um Stämme mit geringen Nährstoffanforderungen zu isolieren. Der Einsatz dieser Substanzen ermöglichte in allen Screening-Durchgängen Wachstum und 1,3-Propandiol-Bildung in den Anreicherungskulturen.

Die Selektivität des Mediums konnte über die Zusammensetzung an die Anreicherungsstrategie sehr gut angepasst werden. Waren im konventionellen Screening über 98 % der Anreicherungskulturen aktiv, so waren es im Screening 3, in dem im Mikromaßstab angereichert wurde, nur 8,5 %.

Im konventionellen Screening 1 wurden die Anreicherungskulturen auf Festmedium vereinzelt und die Produktionsstämme zur Reinkultur aufgereinigt. Die Produktbildung wurde erst im Anschluss kontrolliert. Dieses Verfahren wurde in den Screening-Durchgängen 2 und 4 in

Form der Kolonie-Evaluierung optimiert (vgl. Kapitel 4.4). Hier wurden, vor der aufwendigen Herstellung einer Reinkultur, die Produktionseigenschaften der Mikroorganismen überprüft. Der Einsatz von DWP ermöglicht es, eine hohe Anzahl an Kolonien zu untersuchen, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, die guten Produktionsstämme der Anreicherungskultur auszuwählen. Während im konventionellen Screening 33 Kolonien untersucht wurden, waren es in Screening 2 und 4 je 80 Kolonien. Da dieser Schritt in DWP durchgeführt wurde, sind jedoch auch erheblich höhere Anzahlen möglich.

In Screening 3 kam es zu Wachstumsproblemen in Flüssigkultur, so dass keine Kolonie-Evaluierung möglich war. Eine Untersuchung der Reinkulturen ergab, dass diese in Flüssigkultur das toxische 3-HPA bildeten (vgl. Kapitel 4.5.2). Da der Grund für die Probleme erst bei Untersuchung der Reinkulturen erkannt wurde, sind im Zuge der Anreicherung und Aufreinigung eventuell gute Stämme verloren gegangen. Eine Untersuchung auf 3-HPA in der Anreicherungsphase sowie in der Kolonie-Evaluierung ist daher wichtig.

Eine Aufreinigung zur Reinkultur wurde nur bei positiver Bewertung der Kolonie-Kultur durchgeführt. Getestet wurde die 1,3-Propandiol-Bildung aus Rohglycerin (100 g/L Glycerin-Vorlage) und die 1,3-Propandiol-Toleranz (Produktbildung bei Vorlage von 70 bzw. 80 g/L).

Die Kolonie-Evaluierung verringerte die Zahl der Begleitorganismen, die zur Reinkultur aufgereinigt wurden, erheblich. Im konventionellen Screening 1 waren 19 Begleitorganismen aufgereinigt worden, im Screening 2 waren es fünf und in Screening 4 nur noch einer.

Die Evaluierung der Reinkulturen aus dem konventionellen Screening 1 war erschwert durch den großen Kultivierungsmaßstab und eine unzureichende pH-Pufferung des Kultivierungsmediums. Zur schnellen und ausführlichen Evaluierung der 1,3-Propandiol-bildenden Reinkulturen wurde eine Hochdurchsatz-Strategie in DWP mit Calciumcarbonat-Pufferung entwickelt (vgl. Kapitel 4.2). Die Stammanforderungen des jeweiligen Screening-Verfahrens wurden evaluiert, wobei 1,3-Propandiol-Toleranz das Hauptentscheidungskriterium war. Neben selektiven Anreicherungsmedien hatte vor allem eine erfolgreiche Kolonie-Evaluierung einen positiven Effekt auf die Ergebnisse der Reinkultur-Evaluierung. So zeigten in Screening 3, in dem keine Kolonie-Evaluierung durchgeführt wurde, 20 % der Reinkulturen eine ausreichende 1,3-Propandiol-Toleranz, in Screening 2 waren es 44 % und in Screening 4 sogar 100 %.

Der Einsatz von Rohglycerin in Anreicherung und Kolonie-Evaluierung führte zu Reinkulturen, die dieses Substrat verwerten konnten. Die Evaluierung ergab, dass alle Reinkulturen Rohglycerin zur 1,3-Propandiol-Bildung nutzen können. Die Rohglycerin-Toleranz war am niedrigsten in Screening 2, in dem Clostridien isoliert wurden. Hier war ein Stamm durch Einsatz von über 150 g/L Rohglycerin komplett gehemmt, zwei Produktionsstämme waren in der Lage 150 g/L Rohglycerin zu verwerten. Die Enterobakterien der Screening-Durchgänge 3 und 4 konnten nicht nur bis zu 200 g/L Rohglycerin verwerten, die Produktbildung war im Vergleich zum Einsatz von Pharmaglycerin z. T. sogar erhöht. Bei den hier untersuchten

Stämmen wiesen die Enterobakterien somit gegenüber den Clostridien die deutlich bessere Rohglycerin-Toleranz auf.

Bei der Evaluierung des Nährstoff-Bedarfes wurde überprüft, ob potenzielle Produktionsstämme bei geringen Hefeextrakt-Konzentrationen bzw. bei Ersatz der Nährstoffquelle zur Produktbildung fähig sind. Alle getesteten Produktionsstämme, mit Ausnahme eines Stammes in Screening 2, bildeten aus 100 g/L Glycerin mindestens 70 % der 1,3-Propandiol-Konzentration, die bei der Standardkonzentration an Hefeextrakt gebildet wurde. Die Reinkulturen des Screening 4, die als *K. pneumoniae* identifiziert wurden, zeigten dabei die geringsten Nährstoffansprüche.

Die Evaluierung ergab, dass die Stammanforderungen der Screening-Durchgänge in Anreicherung und Kolonie-Evaluierung erfolgreich umgesetzt wurden. Es konnten potenzielle Produktionsstämme isoliert werden, die Rohglycerin in hohen Konzentrationen verwerteten, hohe Produktkonzentrationen tolerierten und geringe Hefeextraktanforderungen aufwiesen bzw. Ersatzstoff für Hefeextrakt verwerteten.

Die Identifizierung der Reinkulturen ergab, dass in jedem Durchgang eine Spezies bevorzugt isoliert wurde. Im Screening 1 und 2 wurden Clostridien als potenzielle Produktionsstämme isoliert. Die Reinkulturen des Screening-Durchgangs 3 wurden als *C. freundii* identifiziert. Im gruppierten Screening des vierten Durchgangs waren die Produktionsstämme der Spezies *K. pneumoniae* zu zuordnen.

Diese Systematik kann nicht allein auf die Verwendung verschiedener Umweltproben zurückgeführt werden. So wurden beispielsweise die in Screening 2 verwendeten Umweltproben in Screening 3 erneut eingesetzt, jedoch kam es hier nicht zur Anreicherung der bereits in Screening 2 isolierten Produktionsstämme. Da die Reinkulturen des zweiten Screenings Endosporen bildeten, kann die lange Lagerung der Proben zwischen den zwei Screening-Durchgängen nicht dafür verantwortlich gemacht werden.

Ein möglicher Grund für die Isolierung unterschiedlicher Gattungen sind die Unterschiede im Anreicherungsmedium. Rohglycerin und 1,3-Propandiol wurden in den Screening-Durchgängen 2 bis 4 verwendet, jedoch unterschied sich die Art der Supplin-Quelle. In Screening-Durchgang 1 und 2 wurde je 1 g/L Hefeextrakt eingesetzt, hier kam es zur Anreicherung von Clostridien. Eventuell wird deren Wachstum bei niedrigem Nährstoffgehalt, wie es in Screening 3 und 4 vorlag, verzögert. Dort verdrängen andere Arten, wie die in Screening 2 und 3 isolierten Enterobakterien, durch schnelles Wachstum die Clostridien. Wiegel (2006) schlägt für die Anreicherung von Clostridien bei Einsatz eines Mineralsalzmediums zur Förderung des Wachstums Hefeextrakt in Konzentrationen von 0,05 bis 1 g/L vor.

Die Produktionsstämme mit den besten Produktionseigenschaften sind somit den pathogenen *Enterobacteriaceae* zuzuordnen. Die im Screening 1 und 2 isolierten Stämme hatten geringere Rohglycerin-Toleranz und benötigten mehr Nährstoffe. Sie wurden als *C. butyricum*

identifiziert. *C. butyricum* wurde im Anschluss an die experimentellen Arbeiten der Risikogruppe 2 zugeordnet, da einige *C. butyricum* Stämme eines der Botulinum-Toxine bilden. Für einen Einsatz im industriellen Maßstab müsste somit einwandfrei nachgewiesen werden, dass die vorliegenden Mikroorganismen nicht zur Bildung dieses Toxins fähig sind.

Ein Screening-Verfahren nach einem derzeit als nicht pathogen eingestuftem Produktionsstamm ist schwierig. Von den in der Literatur beschriebenen Produktionsstämmen, ist *C. diolis* DSMZ 15410 (Biebl et al., 1992; Abbad-Andaloussi et al., 1995; Reimann et al., 1998; Rehman et al., 2008) der einzige derzeit nicht als pathogen eingestufte 1,3-Propandiol-Produzent. Dieser Stamm ist nah verwandt mit *C. butyricum* und bildet ebenfalls Endosporen.

Schlussfolgerung

Bei Berücksichtigung der bekannten 1,3-Propandiol-Produzenten ist auf Grund von Sicherheitserwägungen ein Screening nach Clostridien sinnvoll. Hierbei ist eine Probenvorbehandlung durch pasteurisieren bei hoher Temperatur ($> 60^{\circ}\text{C}$) durchzuführen, um Konkurrenz durch schnell wachsende Enterobakterien auszuschalten.

Für die Edukt- und Produkt-Konzentration des Anreicherungsmediums wird die Zusammensetzung des Screening-Durchgang 4 (60 g/L Rohglycerin, 60 g/L 1,3-Propandiol) empfohlen. Als Rohglycerin muss die Qualität eingesetzt werden, die in einem industriellen Prozess Verwendung finden soll. Die Supplin-Quelle richtet sich ebenfalls nach den Bedürfnissen eines industriellen Prozesses. Der Einsatz einer nicht komplexen Quelle wie Vitamine erleichtert z. B. das Downstream-Processing, während Ersatzstoffe für Hefeextrakt die Kosten der Fermentation senken.

Die empfohlene Art der Anreicherungskultur ist abhängig vom geplanten Durchsatz. Für ein Hochdurchsatz-Verfahren wird die Anreicherung im Mikromaßstab empfohlen. Soll die Anreicherungsphase ohne Robotersystem absolviert werden, ist die gruppierte Anreicherung gut geeignet. Durch eine anschließende Kolonie-Evaluierung können Hochleistungsproduzenten gezielt aufgereinigt werden. Die Reinkulturen können dann in der beschriebenen Evaluierungs-Prozedur auf die Produktionseigenschaften 1,3-Propandiol-Toleranz, Rohglycerin-Toleranz und Nährstoffbedarf getestet werden, um eine Empfehlung für den Einsatz im pH-geregelten Bioreaktor zu geben.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Screening-Strategien für Produktionsstämme, die für die anaerobe Umsetzung von Rohglycerin aus der Biodiesel-Produktion in hochwertige Chemikalien nutzbar sind. Dies wurde am Beispiel von 1,3-Propandiol untersucht.

Im ersten Schritt wurde das konventionelle, in der Literatur zumeist beschriebene Screening-Verfahren durchgeführt und bewertet. Aus Umweltproben wurden mittels einer Batch-Anreicherung anaerobe Glycerin-verwertende Mikroorganismen angereichert. Die 1,3-Propandiol-bildenden Mischkulturen wurden auf Festmedium vereinzelt und Reinkulturen gewonnen, welche anschließend auf ihre Produktbildung getestet wurden. Weniger als 30 % der isolierten Stämme zeigten 1,3-Propandiol-Bildung. Eine selektivere Anreicherung sowie eine gezielte Isolierung von 1,3-Propandiol-bildenden Mikroorganismen sind somit anzustreben, um die Bearbeitung von Begleitorganismen zu vermeiden.

Für eine Optimierung dieses Screening-Verfahrens sollten die Phasen der Anreicherung, Isolierung und der Evaluierung der Produktionsstämme variiert werden.

Die Optimierung der Anreicherungsphase hatte die Erhöhung des Durchsatzes an Umweltproben und der Selektivität für Produktionsstämme mit hoher 1,3-Propandiol-Toleranz, Verwertung von Rohglycerin und geringem Bedarf an Supplinen zum Ziel. Die Selektivität wurde durch die Variation der Medienzusammensetzung ermöglicht. Der Einsatz von 1,3-Propandiol und Rohglycerin im Anreicherungsmedium verhinderte das Wachstum von Mikroorganismen, die keine Toleranz gegenüber diesen Substanzen besaßen. Die Selektivität des Mediums wurde vor allem über die Zugabe hoher Konzentrationen an 1,3-Propandiol (40 - 100 g/L) reguliert. Die Variation der Nährstoffquelle im Anreicherungsmedium wurde eingesetzt, um Produktionsstämme mit geringen Nährstoffansprüchen bzw. Stämme, die preiswerte Ersatzstoffe für Hefeextrakt nutzten, anzureichern.

Zur Erhöhung des Durchsatzes an Umweltproben wurde ein Scale-down der Anreicherungskultur in den Mikromaßstab durchgeführt, wodurch das Verfahren automatisierbar wird, sich also für ein Hochdurchsatz-Verfahren eignet. Als ein weiteres Anreicherungsverfahren mit hohem Durchsatz wurde die gemeinsame Anreicherung der Umweltproben in Gruppen (Sortiert nach Herkunft) in einer Kultur getestet. Diese ist nicht automatisierbar, ist jedoch durch ihre Einfachheit bei Durchführung ohne Robotersystem vorzuziehen.

Die im Anschluss an die Anreicherung stattfindende Aufreinigung der Produktionsstämme wurde ebenfalls optimiert und selektiver gestaltet. Nach der Vereinzelung der Anreicherungskultur auf Festmedium wurden die Kolonien direkt in Flüssigkultur übertragen. 1,3-Propandiol-bildende Kolonie-Kulturen konnten so schnell identifiziert und hinsichtlich ihrer 1,3-Propandiol-Toleranz und Rohglycerin-Verwertung getestet werden. Nur positiv evaluierte Kolonie-Kulturen wurden zur Reinkultur aufgereinigt und Begleitorganismen

ausgeschlossen. Der Einsatz von 96-Deep-Well-Platten in dieser Phase erlaubte die gleichzeitige Isolierung sehr vieler Kolonien und ermöglicht eine spätere Automatisierung.

Um die potentiellen Produktionsstämme besser beurteilen zu können, wurde eine Methode zur Hochdurchsatz-Evaluierung entwickelt. Durch den Einsatz von 20 bis 30 g/L Calciumcarbonat als zusätzliche pH-Puffer-Substanz konnten die erreichbaren Endkonzentrationen auf das dreifache gesteigert werden (bis zu 56 g/L), ohne dass eine Hemmwirkung durch die Substanz festgestellt wurde. Zur Steigerung der Produktivität wurde die Konzentration an Hefeextrakt auf 2 g/L verdoppelt, die Inkubationsdauer wurde auf 5 d festgelegt. Diese Bedingungen wurden in den Mikromaßstab übertragen, so dass ein automatisierbares Hochdurchsatz-Verfahren und damit eine ausführliche, statistisch abgesicherte Evaluierung möglich sind.

Es wurden insgesamt 27 Reinkulturen aus drei Screening-Durchgängen mit dem optimierten System evaluiert. Zehn Reinkulturen wurden auf Grund der positiven Bewertung ihrer 1,3-Propandiol-Toleranz, das Hauptkriterium, genauer evaluiert. Diese Stämme bildeten bei Vorlage hoher 1,3-Propandiol-Konzentrationen (60 bis 100 g/L) noch Produkt hinzu und erreichten so hohe Endkonzentrationen im Bereich von 80 bis 110 g/L.

Weitere Evaluierungskriterien waren eine hohe Edukt-Toleranz bzw. Rohglycerin-Toleranz und der Bedarf an Supplinen. Die zehn untersuchten Stämme konnten alle Rohglycerin zur 1,3-Propandiol-Produktion nutzen. Bei Einsatz von 200 g/L Rohglycerin waren drei Stämme komplett gehemmt, zwei Stämme waren im Vergleich zur Verwertung von Pharmaglycerin nur geringfügig gehemmt und fünf waren in ihrer Produktbildung sogar gefördert. Die Verringerung des Hefeextrakts um 90 % hemmte neun der zehn Stämme nur geringfügig in der Produktbildung aus 100 g/L Pharmaglycerin. Die in der Anreicherung verwendeten Ersatzstoffe (Vitaminlösung bzw. komplexe Tierfuttermittel) wurden von den Reinkulturen der entsprechenden Screening-Verfahren ebenfalls mit nur geringen Produkteinbußen genutzt.

Im Anschluss an die Evaluierung wurden die Reinkulturen identifiziert. AKR91b, AKR92a und AKR102a aus Screening 2 sowie der nicht evaluierte Stamm AKR17a aus Screening 1 wurden als *C. butyricum* identifiziert und für die Fermentationsoptimierung im Bioreaktor empfohlen. Die übrigen Produktionsstämme wurden als *Enterobacteriaceae*, *C. freundii* und *K. pneumoniae*, identifiziert und auf Grund ihrer Pathogenität nicht weiter untersucht.

Die hervorragenden Produktionseigenschaften der isolierten Stämme demonstrieren die Effektivität und hohe Selektivität der entwickelten Screening-Strategien. Die Durchführung des entwickelten Hochdurchsatz-Screenings ist in fast allen Phasen des Verfahrens (Anreicherung, Kolonie-Evaluierung, Evaluierung der potentiellen Produktionsstämme) automatisierbar. Eine Anpassung der Anreicherungsphase an Rohglycerin eines bestimmten Herstellungsprozesses und an verschiedene Supplin-Quellen ist ebenfalls durchführbar.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit verwendeten Umweltproben ermöglichten vielfach die Anreicherung von 1,3-Propandiol-Produzenten. Die für die Fermentationsoptimierung empfohlenen Clostridien wurden aus Umweltproben isoliert, in denen durch Anwesenheit von Fetten und deren Abbauprodukten eine Vorselektion stattgefunden hat. Solche Proben sollten somit in zukünftigen Screening-Verfahren verstärkt eingesetzt werden. In der gruppierten Anreicherungskultur erwiesen sich zudem Sedimentproben aus Gewässern als vielversprechend. Da Rohglycerin hohe Konzentrationen an Salzen, wie z. B. Natriumchlorid enthält, wäre es hier interessant, Salzwassersedimente zu untersuchen.

Die Hochdurchsatz-Anreicherung aus Screening-Durchgang 3 (vgl. Kapitel 4.3.2) ist automatisierbar. Der Einsatz in einem Robotersystem muss getestet werden, so dass eventuelle Probleme identifiziert und das Verfahren weiter angepasst werden kann. Für den Einsatz im Robotersystem müsste jedoch die Probenvorbereitung variiert werden, um den direkten Einsatz der Umweltproben zu vermeiden. Es muss ein Verfahren entwickelt werden, um die Mikroorganismen möglichst vollständig vom Probematerial zu trennen und in Flüssigphase zu suspendieren.

Die gruppierte Anreicherungskultur aus Screening-Durchgang 4 (vgl. Kapitel 4.3.4) war bisher nicht automatisierbar. Es ist zu überprüfen, ob die Überführung der Anreicherungskulturen in Kultivierungsgefäße, die für den Einsatz im Robotersystem kompatibel sind, möglich ist. So könnten die Vorteile dieses Verfahrens, wie geringere Verdunstung, kurze Analysezeiten und hohe Endkonzentrationen, in ein Hochdurchsatz-Screening übertragen werden.

Das Vorgehen bei der Kolonie-Evaluierung sollte hinsichtlich der 3-HPA-Problematik adaptiert werden. So sollten die 1,3-Propandiol-bildenden Kolonie-Kulturen frühzeitig auf die toxische Substanz getestet werden, um Wachstumsprobleme zu erkennen. Der kolorimetrische Nachweis von 3-HPA (vgl. Kapitel 3.3.3) ist für ein Hochdurchsatz-Verfahren nicht geeignet. 3-HPA kann jedoch qualitativ mittels HPLC-Analyse nachgewiesen werden. Eine quantitative Auswertung ist nicht möglich, da die Substanz bei den vorliegenden Bedingungen (5mM H_2SO_4 und 60°C, vgl. Kapitel 3.3.1) reagiert. Außerdem ist es sinnvoll, in der frühen (noch nicht inhibierten) Wachstumsphase alle Kolonie-Kulturen in ein Kultivierungsmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle zu übertragen, um Rückstellkulturen zu gewinnen.

Die Vereinzelung der Kolonie-Kulturen auf Festmedium ist einer der Schritte des hier entwickelten Verfahrens, deren Durchführung nicht durch ein Robotersystem bewältigt werden kann. Um diesen Schritt zu automatisieren, könnte eine Vereinzelung der Kolonie-Kulturen durch Verdünnung in Flüssigmedium („extinction culture“, vgl. Kapitel 2.1.4) getestet werden. Die Evaluierung der Reinkulturen kann neben den bisher getesteten Stammeigenschaften, 1,3-Propandiol-Toleranz, Rohglycerin-Verwertung und Supplin-Bedarf, auch für die Beurtei-

lung anderer Kultivierungsparameter, wie unterschiedliche Temperatur, Sauerstoffbedingungen oder den Test unterschiedlicher Glycerin-Qualitäten genutzt werden. Weiterhin ist eine Evaluierung der Produktivität bzw. des Wachstums der Isolate wünschenswert. Dies könnte über den Verlauf der optischen Dichte als Maß der Biomasse ermittelt werden. Mit dem hier entwickelten Evaluierungs-System ist dies nicht möglich, da das Material der DWP und das schwerlösliche Calciumcarbonat die Messung stören würden. Jedoch könnte durch Einsatz von Kultivierungsmedium der Standardzusammensetzung (ohne Calciumcarbonat, vgl. Kapitel 3.1.2) und transparenten Mikrotiterplatten in einem dafür kompatiblen Photospektrometer zumindest die Anfangsphase der Kultivierung untersucht werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse würden die Fermentationsoptimierung erheblich vereinfachen (vgl. Wilkens, 2012).

Die in dieser Arbeit isolierten Stämme müssen weiter im pH-geregelten Bioreaktor untersucht werden, um einen geeigneten Stamm für die Fermentationsoptimierung auszuwählen. Dies wurde im Rahmen der Arbeit „Medienoptimierung zur Kostenreduktion der mikrobiellen Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol“ (Wilkens, 2012) erreicht.

Für eine Nutzung der potentiellen Produktionsstämme im großtechnischen Maßstab, muss ausgeschlossen werden, dass es sich um pathogene Stämme handelt. Daher müssen die Isolate der Art *Clostridium butyricum* auf die genetischen Voraussetzungen für die Bildung des Botulinum Typ E Toxins, welches in einigen *C. butyricum* Stämmen nachgewiesen wurde (Wiegand et al., 2006), überprüft werden.

Das Ziel der entwickelten Screening-Strategien, die Entdeckung von Wildtyp Mikroorganismen zur 1,3-Propandiol-Produktion, wurde erreicht. Die hier isolierten Produktionsstämme weisen bereits sehr gute Produktionseigenschaften auf und bilden damit ein sehr gutes Ausgangsmaterial für eine weitere Stammoptimierung, z. B. mittels Mutagenese oder genetischer Modifikation.

Schließlich gilt es zu klären, ob die Übertragung der Strategien für Produzenten anderer anaerober Metabolite aus Glycerin, wie 2,3-Butandiol, Butanol, Bernsteinsäure, Milchsäure etc., möglich ist. Hierfür müssten die Kultivierungsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidbedingungen etc.) und das Anreicherungsmedium (Nährstoffangebot, evtl. Cosubstrate, Produktvorlagen, etc.) an die Anforderungen bekannter Produzenten des neuen Produktes angepasst werden. Handelt es sich um ein Screening nach Substanzen, die ebenfalls vom mikrobiellen Abbau bedroht sind, so ist eine zweistufige Anreicherung wie in Screening-Durchgang 2 zu empfehlen.

7 Anhang

7.1 Chemikalien

Tabelle 7.1: Liste der wichtigsten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Zusatz
1,3-Propandiol	Alfa Aesar	99%
Agar-Agar	Merck	für die Mikrobiologie
Amygdalin Monohydrat	Alfa Aesar	96 %
Bernsteinsäure	Fluka	Zur Analyse; 99,5 %
Biotin	Sima	-
Bromthymolblau	Carl Roth	Zur Analyse
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck	zur Analyse; 99%
CaCO ₃	Carl Roth	ca. 99 %; d _{50%} : 1,0 µm
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	Fluka	Reinst
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	Fluka	≥ 98 %
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck	zur Analyse
D-Ca-Pantothenat	Merck	für biochemische Zwecke
D-(-)-Arabinose	Fluka	> 99%
D-(+)-Cellobiose	sigma	mind. 98%
D-(+)-Galactose	EGA	-
D-(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth	für die Mikrobiologie
D-(+)-Lactose Monohydrat	Südzucker Ag	-
D-(-)-Mannitol	Merck	-
D-(+)-Melezitose Monohydrat	Alfa Aesar	99 %
D-(+)-Melibiose Monohydrat	Merck	für die Mikrobiologie
D-(-)-Ribose	Calbiochem	reinst
D-(-)-Salicin	Alfa Aesar	99 %
D-(-)-Sorbitol	Merck	Reinst
D-(+)-Trehalose Dihydrat	Fluka	Für die Mikrobiologie
D-(+)-Xylose	Fluka	Für biotechnologische Zwecke
Dimethylsulfoxid	Carl Roth	99,5% für die Molekularbiologie
Esculin	Serva	reinst
Essigsäure	Carl Roth	Zur Analyse; 100 %
Ethanol	Carl Roth	Zur Analyse; 99,8%
FeCl ₃ · 4 H ₂ O	Merck	wasserfrei, zur Synthese
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	Merck	zur Analyse
Folsäure	Merck	für biochemische Zwecke
Glycerin	Carl Roth	98 %
H ₃ BO ₃	Riedel-de Haën	zur Analyse
Hefeextrakt	Merck	granuliert für die Mikrobiologie
H ₂ SO ₄	Riedel-de Haën	Fixanal
Kaliumformiat	Fluka	Zur Analyse
KH ₂ PO ₄	Merck	zur Analyse

Chemikalien	Hersteller	Zusatz
K ₂ HPO ₄	Merck	reinst
Liponsäure	Merck	-
L-(+)-Arabinose	Fluka	Zur Analyse
MacConkey-Nähragar	Carl Roth	Für die Mikrobiologie
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Fluka	≥ 99,5 %
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	Merck	zur Analyse
m-Erythritol	Fluka	HPLC-Grade
m-Inositol	Merck	für die Mikrobiologie
NaCl	Merck	zur Analyse
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	Merck	zur Analyse
NaHCO ₃	Merck	Zur Analyse
NaOH	Merck	zur Analyse; Plättchen
Na ₂ HPO ₄	Fluka	zur Analyse; > 90 %
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	Fluka	zur Analyse
NH ₄ Cl	Merck	zur Analyse
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	Fluka	zur Analyse
Nikotinsäure	Merck	HPLC-Grade
Nitrilotriessigsäure	Merck	zur Analyse
n-Buttersäure	Fluka	zur Analyse; GC-/HPLC-Grade
Pepton aus Fleisch	Difco	enzymatischer Proteinauflschluss
Phenolrot	Carl Roth	Zu Analyse
Propionsäure	Fluka	GC-Qualität; > 99,5 %
Pyridoxin-HCl	Fluka	reinst; 99%
p-Aminobenzoessäure	Fluka	zur Synthese
D-(+)-Raffinose Pentahydrat	Alfa Aesar	99 %
Resazurin-Natriumsalz	Sigma	-
Riboflavin	Merck	für biochemische Zwecke
Salzsäure	Merck	Zur Analyse; 37 % rauchend
Thiamin-HCl · 2 H ₂ O	Sigma	-
Trypton / Pepton aus Casein	Carl Roth	für die Mikrobiologie
Tryptophan	Fluka	reinst
Vitamin B ₁₂ Cyanocobalamin	Merck	97%
ZnCl ₂	Merck	zur Analyse

7.2 Geräte und Materialien

Tabelle 7.2: Liste der wichtigsten Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysewaage	Sartorius Analytic CTI 5108	Sartorius, Deutschland
Anaerobierbank	Bactron IV	SHEL LAB, USA
Anaerobier-Topf	-	Dinkelberg Analytics GmbH, Deutschland
Heizwasserbad	Typ 1005	GFL, Deutschland
Inkubator	Typ BK 5060 E	Heraeus Instruments, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller
Laborwaage	Sartorius universal, U 4600 P+	Sartorius, Deutschland
Mehrkanalpipette,	8-Kanal, 50-1200 µl eLine 1200	Biohit, Deutschland
Mehrkanalpipette	8-Kanal, 30-300 µl, mLine 300	Biohit, Deutschland
Mehrkanalpipette	8-Kanal, 5-100 µl, mLine 100	Biohit, Deutschland
Mehrkanalpipette	8-Kanal, 0,5-10 µl, mLine 10	Biohit, Deutschland
Mikroelektrode	InLab Micro	Mettler Toledo, Deutschland
Mikroskop	Axioplan	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikrotiterplattenschüttler	Thermo Shaker PST-60HLplus	Kisker, Deutschland
Sterilbank	HeraSafe Typ HS 18/2	Heraeus Instruments, Deutschland
Tischautoklav	2540 ELC	Tuttnauer, Niederlande
Reinstwasseranlage	Milli-Q Plus 185	Millipore, USA
Rührer	Variomag Telesystem 15	H+P Labortechnik AG, Deutschland
pH-Meter	pH 526	WTW GmbH, Deutschland
Photospektrometer (MTP)	Easy Reader EAR 400 AT	SLT-Labinstruments/Tecan, Deutschland
Photospektrometer	T80 UV/VIS	PG Instruments Ltd., Großbritannien
Trockenschrank	UE400	Memmert, Deutschland
Schüttler	IKA-Minishaker MS2	IKA, Deutschland
Zentrifuge	5417, Rotor F 45-24-11	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge	Rotana 46R; Rotor5624	Hettich, Deutschland

Tabelle 7.3: Liste spezieller Materialien und kommerzieller Testsysteme

Spezielle Materialien / kommerzielle Tests	Hersteller
Acetatfolie	Sarstedt, Deutschland
Anaerocult A-System	Merck, Deutschland
Anaerotest	Merck, Deutschland
Aluminiumkappen	Macherey-Nagel, Deutschland
Bactident Aminopeptidase-Test	Merck, Deutschland
Bactident Oxidase-Test	Merck, Deutschland
BBL Enterotube II	Becton Dickinson, USA
Butylgummi-Septen	Macherey-Nagel, Deutschland
MegaBlock 96 Well	Sarstedt, Deutschland
Mikrotiterplatte	Sarstedt, Deutschland
Parafilm	Brand, Deutschland
Viskose-Folie	Carl Roth, Deutschland
Kovacs Indol Reagenz Microbact	Oxoid, Deutschland
Rollrandflaschen (20 bzw. 50 mL)	IDL, Deutschland
Spritzenfilter, Porengröße: 0,22 µm	Carl Roth, Deutschland
Voges-Proskauer-Reagenz Microbact	Oxoid, Deutschland
Einmalspritzen, 2-teilig, steril	Braun, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanülen steril	Braun, Deutschland

7.3 Herkunft der Umweltproben

Tabelle 7.4: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 1

Nr.	Art der Probe	Ort der Probenahme	Zeitpunkt der Probenahme
1	Palmölkompst	Indonesien	02/2003
2	Waldboden	Braunschweig	09/2007

Tabelle 7.5: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 2

Nr.	Art der Probe	Ort der Probenahme	Zeitpunkt der Probenahme
3	Erdprobe - Palmölraffinerie	Indonesien	11/2007
4	Erdprobe - Palmölraffinerie	Indonesien	11/2007
5	Erdprobe - Palmölraffinerie	Indonesien	11/2007

Tabelle 7.6: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 3

Nr.	Art der Probe	Ort der Probenahme	Zeitpunkt der Probenahme	Sauerstoffbedingungen	
				Anaerobe Inkubation	Raumluft Inkubation
3	Erdprobe - Palmölraffinerie	Indonesien	11/2007	-	+
4	Erdprobe - Palmölraffinerie	Indonesien	11/2007	-	+
6	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	+
7	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	-
8	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	-
9	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	-
10	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	+
11	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	-
12	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	-
13	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	+
14	Erdprobe	Indonesien	02/2008	+	-
15	Kompost	Wiesenfeld	12/2008	+	-
16	Kompost	Karlsstadt	12/2008	+	-
17	Kompost	Reitersbach	12/2008	+	-
18	Kompost	Potsdam	12/2008	+	-
19	Kompost	Hamburg	01/2009	+	-
20	Kompost	Hamburg	01/2009	+	-
21	Kompost	Hamburg	10/2008	+	-
22	Kompost	Hamburg	10/2008	+	-
23	Kompost	Eschenrode	11/2008	+	-
24	Kompost	Eschenrode	11/2008	+	-
25	Kompost	Eschenrode	11/2008	+	-
26	Misthaufen	Eschenrode	11/2008	+	+
27	Gemüse-/Erdbeerbeet	Wittbek	01/2009	+	+
28	ehemaliger Kompost	Braunschweig	02/2009	+	-
29	Kompost	Neu Kaliß	02/2009	+	-
30	Apfelwein	Hamburg	02/2009	+	-
31	Kompost	Nordhausen	03/2009	+	-
32	Kompost	Kassel	04/2009	+	-

Nr.	Art der Probe	Ort der Probenahme	Zeitpunkt der Probenahme	Sauerstoffbedingungen	
				Anaerobe Inkubation	Raumluf Inkubation
33	Kompost	Groß Ilsede	02/2009	+	-
34	Kompost	Groß Ilsede	02/2009	+	-
35	Acker/Raps2009;	Braunschweig	05/2009	+	+
36	Acker/Raps2009;	Braunschweig	05/2009	+	-
37	Acker/Raps2006;	Braunschweig	05/2009	+	+
38	Acker/Raps2006;	Braunschweig	05/2009	+	-
39	Acker/Raps2003;	Braunschweig	05/2009	+	+
40	Acker/Raps2003;	Braunschweig	05/2009	+	-
41	Kompost; 50 cm	Braunschweig	05/2009	+	-
42	Kompost; 25 cm	Braunschweig	05/2009	+	-
43	Kompost; 0 cm	Braunschweig	05/2009	+	+
44	Kompost reif mit Sand	Wendeburg	06/2009	+	-
45	Thermokompost	Wendeburg	06/2009	+	-
46	Kompost und Boden – 10 cm	Wendeburg	06/2009	+	-
47	Faulschlamm / Regentonne	Wendeburg	06/2009	+	-
48	Kaninchenkot	Braunschweig	06/2009	+	-
49	Kaninchenkot	Braunschweig	06/2009	+	-

Tabelle 7.7: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 4

Nr.	Art der Probe	Ort der Probenahme	Zeitpunkt der Probenahme	Anreicherungs-Gruppe
51	Kompost – 20 cm	Brieskow-Finkenheerd	04/2010	Mist
52	Hühnermist	Eschenrode	04/2010	
53	Schafmist	Eschenrode	04/2010	
54	Misthaufen – 15 cm	Eschenrode	04/2010	
55	Pferdemist	Braunschweig	05/2010	
56	Rindermist	Braunschweig	05/2010	
57	Schafmist	Braunschweig	05/2010	
58	Flusssediment; Ufer	Braunschweig	05/2010	Gewässer-sediment
59	Flusssediment; Ufer	Braunschweig	05/2010	
60	Teichschlamm; Ufer	Braunschweig	05/2010	
61	Teichsediment; Graben	Braunschweig	05/2010	
62	Teichschlamm; Ufer	Braunschweig	05/2010	
63	Flusssediment; Ufer	Grasdorf, Hannover	04/2010	
64	Kompost; 20 - 30 cm	Hamburg	04/2010	Kompost
65	Kompost - reif	Hamburg	04/2010	
66	Kompost	Wendeburg	05/2010	
67	Kompost	Wendeburg	05/2010	
68	Thermokompost	Wendeburg	05/2010	
69	Kompost; 20 cm	Wendeburg	04/2010	
70	Kompost - reif	Neu Kaliß	04/2010	
71	Weideland	Braunschweig	04/2010	
72	Blumenerde	-	05/2010	

7.4 Kalibrierungen

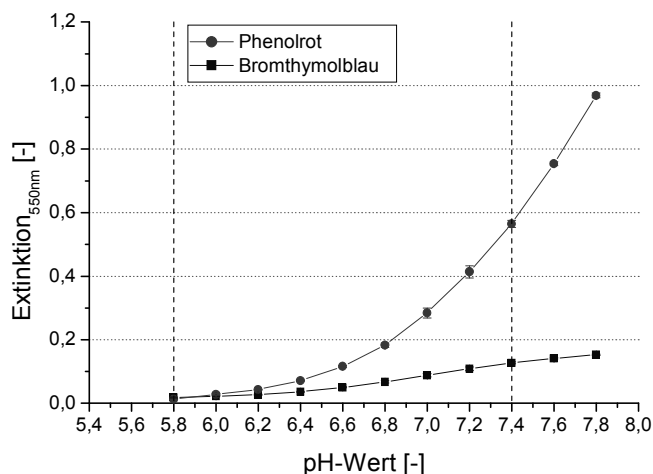


Abbildung 7.1: Verlauf der Extinktion in Abhängigkeit des pH-Wertes bei Einsatz einer Phenolrot- bzw. Bromthymolblaulösung (20 mg/L)

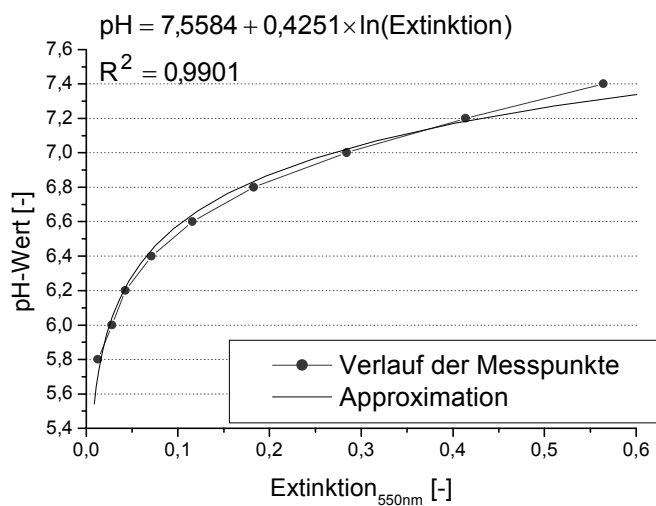


Abbildung 7.2: Kalibrierung zur Bestimmung des pH-Wertes mittels Phenolrot (20 mg/L)

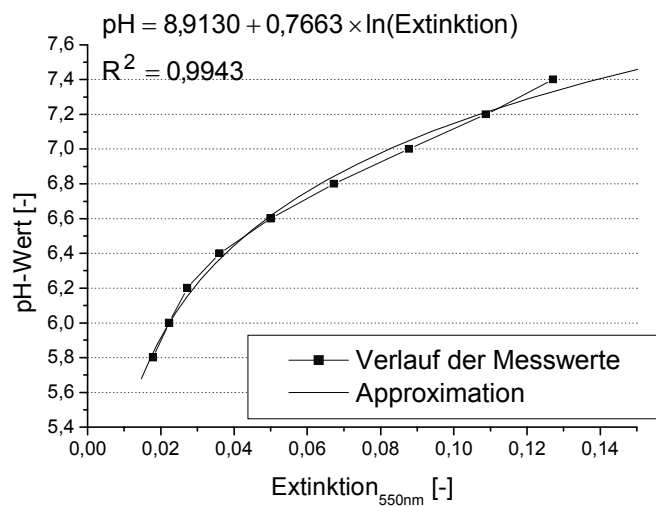


Abbildung 7.3 Kalibrierung zur Bestimmung des pH-Wertes mittels Bromthymolblau (20 mg/L)

7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Allgemeines Schema eines industriellen Screening-Programms (modifiziert nach Steele und Stowers (1991)).....	3
Abbildung 2.2:	Chemische Synthese von Fettsäuremethylester (Biodiesel)	13
Abbildung 2.3:	Entwicklung des Biodieselsverbrauchs in Deutschland von 2002 bis 2010 (Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat), 2011; UFOP, 2011a) .	14
Abbildung 2.4:	Mikrobielle Stoffwechselwege zur Konversion von Glycerin zu Chemikalien unter anaeroben Bedingungen; adaptiert nach Choi (2008)	18
Abbildung 2.5:	Chemische Synthese von 1,3-Propandiol; adaptiert nach Steverding (2010)	19
Abbildung 2.6:	Mikrobielle Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol	21
Abbildung 2.7:	Molekulare Struktur von Polytrimethylenterephthalat (PTT, nach Kurian 2005).....	25
Abbildung 2.8:	Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme des Stammes <i>C. butyricum</i> NRRL 1024 bei Kultivierung in Standardmedium (Mineralsalzmedium mit 25 g/L Pharmaglycerin und 1 g/L Hefeextrakt), Maßstab = 20µm: (A, B) Kultivierung auf Festmedium; (C) Kultivierung in Flüssigmedium	31
Abbildung 3.1:	Anaerobierbank Bactron IV der Firma SHEL LAB (USA); (1) Vakuumschleuse, (2) anaerober Arbeitsraum, (3) handschuhfreie Armschleuse, (4) Inkubator	35
Abbildung 3.2:	Vergleich der Rohglycerine vor und nach Umstellung des Biodiesel-Herstellungsprozesses; (A) Rohglycerin der 2. Charge, Katalysator Kaliummethylat (B) Rohglycerin der 3. Charge, Katalysator Natriummethylat	37
Abbildung 3.3:	Erläuterung zur Medienkurzbezeichnung für Screening-Medien	38
Abbildung 3.4:	Aufbau eines Hungate-Röhrchens; (A) Rollrandflasche mit Butylgummi-Septum und Aluminiumkappe, (B) befülltes Hungate-Röhrchen	43
Abbildung 3.5:	96-Deep-Well-Platte (Abmessungen: 128 x 86 x 44 mm, Volumen pro Well: 1,2 mL), verschlossen mit Gasdurchlässiger Folie, Mikrotiterplatten-Deckel und Parafilm; (A) von oben (B) von der Seite	44
Abbildung 3.6:	Chromatogramm (RI-Detektor) des verdünnten Kulturüberstandes (1:21, 20µL Probeschleife); Inkubation für 5 Tage in DWP, Stamm AKR92a, Pharmaglycerin-Startkonzentration 100 g/L	47
Abbildung 3.7:	Chromatogramm (UV-Detektor) des verdünnten Kulturüberstandes (1:21, 20 µL Probeschleife); Inkubation für 5 Tage in DWP, Stamm AKR92a, Pharmaglycerin-Startkonzentration 100 g/L	47
Abbildung 3.8:	Mikrotiterplatte mit 20 mg/L Kalibrierungslösungen in 0,1 mol/L Phosphatpuffer bei pH-Werten 5,8 bis 7,8 ; (A) Phenolrot, (B) Bromthymolblau	49
Abbildung 3.9:	BD BBL Enterotube II Test-System zur stoffwechselphysiologischen Identifikation von Enterobakterien.....	51
Abbildung 4.1:	Schritte des konventionellen 1,3-Propandiol Screening-Verfahrens	56
Abbildung 4.2:	Schematischer Verlauf des konventionellen Screenings – Medienabkürzung vgl. Kapitel 3.1.6	57
Abbildung 4.3:	Rohglycerin-Toleranz der Stämme des konventionellen Screenings nach 7 d Kultivierung (Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)	62
Abbildung 4.4:	Reaktionen von Calciumcarbonat im sauren Milieu	67
Abbildung 4.5:	Verlauf der 1,3-Propandiol-Konzentration bei Einsatz von 0 und 10 g/L CaCO ₃ mit 1 bzw. 2 g/L Hefeextrakt - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 75 g/L Pharmaglycerin, anaerob, 32°C, 250 upm, Pfeil markiert Glycerin-Zugabe in Kultivierung mit 10 g/L CaCO ₃ und 2 g/L Hefeextrakt (o))	67

Abbildung 4.6:	Verlauf des pH-Wertes bei Einsatz von 0 und 10 g/L CaCO_3 mit 1 bzw. 2 g/L Hefeextrakt - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 75 g/L Pharmaglycerin, anaerob, 32°C, 250 upm, Pfeil markiert Glycerin-Zugabe in Kultivierung mit 10 g/L CaCO_3 und 2 g/L Hefeextrakt (o)).....	68
Abbildung 4.7:	Verlauf der 1,3-Propandiol-Konzentration bei Einsatz von 0, 10, 15 und 20 g/L CaCO_3 - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 250 upm).....	70
Abbildung 4.8:	Verlauf des pH-Wertes bei Einsatz von 0, 10, 15 und 20 g/L CaCO_3 - Kultivierung des Stammes AKR17b (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 250 upm).....	70
Abbildung 4.9:	Evaluierung des Verdunstungseinflusses auf die Standardlösungen 1 und 2 - Lage der untersuchten Wells in der DWP	72
Abbildung 4.10:	Einfluss der Verdunstung auf die Konzentrationen der Standardlösung 1 während der Kultivierung in einer DWP (Bedingungen: 1mL Standard pro Well, verschlossen mit gasdurchlässiger Viskosefolie, 350 upm, 32°C im Inkubator der Anaerobierbank) – prozentuale Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer	73
Abbildung 4.11:	Einfluss der Verdunstung auf die Konzentrationen der Standardlösung 2 während der Kultivierung in einer DWP (Bedingungen: 1mL Standard pro Well, verschlossen mit gasdurchlässiger Viskosefolie, 350 upm, 32°C im Inkubator der Anaerobierbank) – prozentuale Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer	73
Abbildung 4.12:	1,3-Propandiol-Konzentration bei Einsatz von 20, 25 und 30 g/L CaCO_3 , bestimmt nach 4, 5 und 6 d Inkubation und korrigiert nach Gleichung 4.2 und Gleichung 4.3 - Kultivierung von <i>C. b. NRRL 1024</i> (Schüttelkolben, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 350 upm); Pfeil markiert optimale Bedingungen im Schüttelkolben.....	76
Abbildung 4.13:	pH-Wert bei Einsatz von 20, 25 und 30 g/L CaCO_3 , bestimmt nach 4, 5 und 6 d Inkubation und korrigiert nach Gleichung 4.2 und Gleichung 4.3 - Kultivierung von <i>C. b. NRRL 1024</i> (DWP, Mineralsalzmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin und 2 g/L Hefeextrakt, anaerob, 32°C, 350 upm); Pfeil markiert optimale Bedingungen im Schüttelkolben.....	77
Abbildung 4.14:	Schematischer Verlauf des 2. Screening-Durchgangs – Erdprobe 1	82
Abbildung 4.15:	Schematischer Verlauf des 2. Screening-Durchgangs – Erdprobe 2 und 3	82
Abbildung 4.16:	Scale-down in der Anreicherungsphase - Screening-Durchgang 3	84
Abbildung 4.17:	Gruppierte Anreicherungskultur - Screening-Durchgang 4	92
Abbildung 4.18:	Beurteilung Sauerstoff-Einflusses – Bernsteinsäure-Bildung nach 5 d Kultivierung bei Raumluft bzw. im Anaerobier-Topf (Mineralsalzmedium mit 40 g/L Pharmaglycerin, 32°C, ungeschüttelt) – rechnerisch korrigierte Werte.....	105
Abbildung 4.19:	Beurteilung der Produkt-Toleranz der Kolonie-Kulturen des Screenings 3b – Bernsteinsäure-Bildung bzw. Glycerin-Verbrauch nach 5 d Kultivierung (Mineralsalzmedium mit 40 g/L Pharmaglycerin und Vorlage von 10, 20, 30 und 40 g/L Bernsteinsäure, Raumluft, 32° C, ungeschüttelt) – rechnerisch korrigierte Werte.....	106
Abbildung 4.20:	Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR50, 80a, 82a, 91a, 91b, 92a, 102a, 102b und 103a – 1,3-Propandiol-Zunahme nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 30, 40, 50, 60 und 77 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte.....	111

Abbildung 4.21: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR91b, AKR92a, AKR102a – 1,3-Propandiol-Vorlage, -Zunahme durch Bildung und -Zunahme durch Verdunstung nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 30, 40, 50, 60 und 77 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C, 350 upm).....	113
Abbildung 4.22: Evaluierung der (Roh-)Glycerin-Toleranz von AKR91b, AKR92a, AKR102a - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100, 150 und 200 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte.....	114
Abbildung 4.23: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz von AKR91b, AKR92a und AKR102a nach Gleichung 4.1 (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L und 150 g/L Roh- bzw. Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte	115
Abbildung 4.24: Evaluierung des Supplin-Bedarfes von AKR91b, AKR92a, AKR102a - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 bzw. 0,2 g/L Hefeextrakt, 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte.....	117
Abbildung 4.25: 1,3-Propandiol-Konzentration der Screening 3 Reinkulturen nach 2 d Kultivierung - Hungate-Röhrchen, Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 25 bzw. 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt	119
Abbildung 4.26: 3-HPA-Konzentration der Reinkulturen des Screenings 3 nach 2 d Kultivierung - Hungate-Röhrchen, Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 25 bzw. 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt	120
Abbildung 4.27: Einfluss des Vorkultursubstrates auf die Evaluierung – Vorkulturen enthielten 50 g/L Pharmaglycerin bzw. 10 g/L Glucose, getestet wurden AKR197, 186, 246, 247, 249b und 253. 1,3-Propandiol- nach 5 d (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte	122
Abbildung 4.28: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR197, 186, 244, 246, 247, 249a, 249b, 250, 253 und 263 – 1,3-Propandiol-Zunahme nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 60, 70, 80 und 90 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C 350, upm); rechnerisch korrigierte Werte.....	123
Abbildung 4.29: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR249b und AKR263 – 1,3-Propandiol-Vorlage, -Zunahme durch Bildung und -Zunahme durch Verdunstung nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 60, 70, 80 und 90 g/L 1,3-Propanidol, anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte	124
Abbildung 4.30: Evaluierung der (Roh-)Glycerin-Toleranz der Stämme AKR249b und AKR263 - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100, 150 und 200 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 30 g/L CaCO ₃ , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte	125
Abbildung 4.31: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz der Stämme AKR249b und AKR263 nach Gleichung 4.1 nach 7 d Kultivierung (optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L, 150 g/L und 200 g/L Roh- bzw. Pharmaglycerin, 30 g/L CaCO ₃ , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte.....	126
Abbildung 4.32: Evaluierung des Supplin-Bedarfes von AKR249b und AKR263 - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 bzw. 0,2 g/L Hefeextrakt, 5 mL/L Vitaminlösung DSMZ 141; 30 g/L CaCO ₃ , 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte.....	127
Abbildung 4.33: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a, AKR323b, AKR323c und AKR339 – 1,3-Propandiol-Zunahme nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 70, 80, 90, 100 g/L 1,3-Propanidol, 30 g/L CaCO ₃ , anaerob 32°C, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte.....	128

- Abbildung 4.34: Evaluierung der 1,3-Propandiol-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a – 1,3-Propandiol-Vorlage, -Zunahme durch Bildung und – Zunahme durch Verdunstung nach 5 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 60 g/L Pharmaglycerin, Vorlage von 0, 70, 80, 90 und 100 g/L 1,3-Propanidol, 30 g/L CaCO_3 , anaerob 32°C 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte..... 129
- Abbildung 4.35: Evaluierung der (Roh-)Glycerin-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a - 1,3-Propandiol-Zunahme nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100, 150 und 200 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 30 g/L CaCO_3 , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte..... 130
- Abbildung 4.36: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a nach Gleichung 4.1 nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L, 150 g/L und 200 g/L Rohglycerin (Charge3) bzw. Pharmaglycerin, 30 g/L CaCO_3 , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte..... 131
- Abbildung 4.37: Evaluierung der Rohglycerin-Toleranz der Stämme AKR282, AKR286, AKR298a und AKR323a nach Gleichung 4.1 nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium, 100 g/L, 150 g/L und 200 g/L Rohglycerin (Charge 2) bzw. Pharmaglycerin, 30 g/L CaCO_3 , 32°C, anaerob, 350 upm); rechnerisch korrigierte Werte, n. g.: nicht getestet 132
- Abbildung 4.38: Evaluierung des Supplin-Bedarfes der Stämme AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a - 1,3-Propandiol-Bildung nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 bzw. 0,2 g/L Hefeextrakt, 5 mL/L Vitaminlösung DSMZ 141; 30 g/L CaCO_3 , 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 300 upm); rechnerisch korrigierte Werte 133
- Abbildung 4.39: Evaluierung des Supplin-Bedarfes von AKR266, AKR282, AKR286, AKR298a, AKR323a - 1,3-Propandiol-Bildung nach 7 d Kultivierung (DWP, optimiertes Evaluierungsmedium mit 2 g/L des Hefeextrakt-Ersatzstoffes (Sojaproteinkonzentrat, Kartoffelprotein, Maiskleber, Weizenkleber) bzw. Mischung der Ersatzstoffe (Summe 2 g/L); 30 g/L CaCO_3 , 100 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, 300 upm); rechnerisch korrigierte Werte 134
- Abbildung 7.1: Verlauf der Extinktion in Abhängigkeit des pH-Wertes bei Einsatz einer Phenolrot- bzw. Bromthymolblaulösung (20 mg/L) 160
- Abbildung 7.2: Kalibrierung zur Bestimmung des pH-Wertes mittels Phenolrot (20 mg/L)..... 160
- Abbildung 7.3 Kalibrierung zur Bestimmung des pH-Wertes mittels Bromthymolblau (20 mg/L)..... 160

7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Kommerziell erhältliche Testsysteme für die phänotypische Identifizierung von Bakterien	9
Tabelle 2.2:	Chemische und physikalische Eigenschaften von Glycerin (> 98 % Carl Roth, Deutschland) bei 20 °C nach Herstellerangaben	12
Tabelle 2.3:	Chemische und physikalische Eigenschaften von 1,3-Propandiol bei 20 °C nach Steverding (2010)	19
Tabelle 2.4:	Zusammenfassung in der Literatur beschriebener Screening-Verfahren nach natürlichen Produktionsstämmen für die 1,3-Propandiol-Produktion aus Glycerin -	29
Tabelle 3.1:	Zusammensetzung der Spurenelementlösung DSMZ 144	33
Tabelle 3.2:	Standardzusammensetzung des Mineralsalzmediums	34
Tabelle 3.3:	Zusammensetzung der Vitaminlösung DSMZ 141	35
Tabelle 3.4:	Zusammensetzung des Rohglycerins nach Herstellerangaben (Biopetrol Schwarzheide GmbH, Deutschland)	36
Tabelle 3.5:	Tierfuttermittelzusätze für als Ersatz für Hefeextrakt	37
Tabelle 3.6:	Zusammensetzung der Anreicherungsmedien für die Screening-Durchgänge 1 bis 4 ..	39
Tabelle 3.7:	Zusammensetzung der Evaluierungsmedien für die Screening-Durchgänge 2 bis 4	40
Tabelle 3.8:	Zusammensetzung des MacConkey-Agar der Firma Carl Roth (Deutschland)	41
Tabelle 3.9:	Adaptierte Zusammensetzung des PYX-Medium DSMZ 104b (DSMZ, 2011)	41
Tabelle 3.10:	Zusammensetzung der Salzlösung DSMZ 104 (DSMZ, 2011)	42
Tabelle 3.11:	Geräteliste und Prozessparameter des HPLC-Systems	47
Tabelle 3.12:	Eigenschaften der pH-Indikatorfarbstoffe Phenolrot und Bromthymolblau	48
Tabelle 3.13:	Kolonieformen 1,3-Propandiol-bildender Enterobakterienarten auf MacConkey-Agar laut Herstellerangaben (Carl Roth, Deutschland)	51
Tabelle 3.14:	Biochemische Tests zur Identifizierung von Enterobakterien mit dem BBL Enterotube II (BD, USA)	52
Tabelle 3.15:	Verwendete Substanzen für den Test auf Substratverwertung	53
Tabelle 3.16:	Charakteristika der zum Screening eingesetzten Proben	54
Tabelle 3.17:	Probeneinsatz und Vorbehandlung	55
Tabelle 4.1:	Anreicherungsbedingungen der konventionellen Anreicherungsstrategie	57
Tabelle 4.2:	Übersicht über die mit Palmölkompost beimpften Anreicherungskulturen - Kultivierungshergang und Ergebnisse der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung im Hungate-Röhrchen (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt); grau hinterlegt: ausgewählte Kulturen zur Aufreinigung	58
Tabelle 4.3:	Übersicht über die mit Waldboden beimpften Anreicherungskulturen - Kultivierungshergang und Ergebnisse der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung im Hungate-Röhrchen (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt) grau hinterlegt: ausgewählte Kulturen zur Aufreinigung	59
Tabelle 4.4:	Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharma- bzw. Rohglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)	60
Tabelle 4.5:	Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Flüssigmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)	61

Tabelle 4.6:	Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des konventionellen Screening-Verfahrens	63
Tabelle 4.7:	pKs-Werte einiger organischer Säuren, die als Nebenprodukte der Glycerin-Verwertung entstehen (vgl. Abbildung 2.4) (Lide, 2004; Beyer et al., 2004)	66
Tabelle 4.8:	Zusammensetzung der Standardlösungen zur Bestimmung der Verdunstung in DWP .	72
Tabelle 4.9:	Definition der gewünschten Stammeigenschaften für einen 1,3-Propandiol-Hochleistungsproduzenten und deren Auswirkungen	79
Tabelle 4.10:	Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 2	80
Tabelle 4.11:	Umweltproben als Inokulum für die Anreicherungskulturen des 2. Screening-Durchgangs	81
Tabelle 4.12:	Anreicherungsmedien des zweiten Screening-Durchgangs – Standard Mineralsalzmedium mit Zusatz von Edukt und Produkten	81
Tabelle 4.13:	Übersicht über Kultivierungshergang Ergebnisse der Kulturen der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung im Hungate-Röhrchen (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt); grau hinterlegt: ausgewählte Kulturen zur Aufreinigung	83
Tabelle 4.14:	Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 3a	85
Tabelle 4.15:	Anreicherungsmedien des dritten Screening-Durchgangs – Standard Mineralsalzmedium mit Zusatz von Edukt, Produkt und pH-Indikatoren	85
Tabelle 4.16:	Übersicht über die Anreicherungskulturen, Kultivierungshergang und Ergebnisse der vierten Anreicherungskultur - 7 d Kultivierung in DWP (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)	88
Tabelle 4.17:	Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 3b	89
Tabelle 4.18:	Übersicht über die Anreicherungskulturen, Kultivierungshergang und Ergebnisse der zweiten Anreicherungsphase - 7 d Kultivierung in DWP (Mineralsalzmedium, 32°C, aerob, ungeschüttelt)	91
Tabelle 4.19:	Übersicht über Anreicherungskulturen zur Vereinzelung - 7 d Kultivierung in DWP (Mineralsalzmedium, 32°C, aerob, ungeschüttelt)	92
Tabelle 4.20:	Anreicherungsbedingungen des Screening-Durchgangs 4	93
Tabelle 4.21:	Anreicherungsmedium des 4. Screening-Durchgangs – Standard Mineralsalzmedium mit Zusatz von Edukt, Produkt, Hefeextraktersatzstoffen und pH-Indikatoren	94
Tabelle 4.22:	Übersicht über die Anreicherungskulturen des Screening-Durchgang 4 - Ergebnisse der zweiten Anreicherungskultur – 66 h Kultivierung in Schüttelkolben (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, 350 upm)	94
Tabelle 4.23:	Übersicht über Anreicherungskulturen zur Vereinzelung, Ergebnisse und Anreicherungsprozess – Kultivierung im Schüttelkolben (Mineralsalzmedium, 32°C, anaerob, 350 upm)	95
Tabelle 4.24:	Ergebnisse der Kolonien-Evaluierung des Screenings 2 – Medien RG 50 0 (Inokulum von Festmedium), RG 100 0+CO ₃ , RG15 70 (Inokulum von DWP, 7 d anaerobe Inkubation in DWP, 32 °C, 350 upm) – Werte rechnerisch korrigiert	98
Tabelle 4.25:	Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium mit 25 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)	99
Tabelle 4.26:	Ergebnisse der Kultivierung der Reinkulturen des Screenings 3a nach 5 d Kultivierung (Hungate-Röhrchen, Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)	101
Tabelle 4.27:	Ergebnisse der Kolonien-Evaluierung des Screening 3b nach 7 d Kultivierung (Inokulum von DWP, Mineralsalzmedium, 100 g/L Pharmaglycerin, 20 g/L CaCO ₃ , 32°C, aerob, ungeschüttelt) – gemessene Werte ohne rechnerische Korrektur	102

Tabelle 4.28: Ergebnisse der Kolonien-Evaluierung des Screenings 4 – Medien PG 100 0+CO ₃ , RG 100 0+CO ₃ , PG 60 80+CO ₃ (Inokulum von DWP, 5 d anaerobe Inkubation in DWP, 32 °C, 350 upm) – Werte rechnerisch korrigiert.....	107
Tabelle 4.29: Ergebnisse der Batch-Kultivierung der isolierten Stämme nach 7 d Kultivierung (Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 25 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt)	109
Tabelle 4.30: Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des Screening-Durchgangs 2.....	118
Tabelle 4.31: Ergebnisse der Screening 3 Reinkulturen nach 2 d Kultivierung - Inokulum von Festmedium, Mineralsalzmedium der Standardzusammensetzung mit 50 g/L Pharmaglycerin, 32°C, anaerob, ungeschüttelt	121
Tabelle 4.32: Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des dritten Screening-Durchgangs.....	128
Tabelle 4.33: Ergebnisse der Evaluierung und Charakterisierung der isolierten Stämme des Screening-Verfahrens 4	135
Tabelle 4.34: Charakterisierung der für eine Fermentationsoptimierung ausgewählten Reinkulturen der Screening-Durchgänge 1 bis 4 (links)	140
Tabelle 4.35: Identifizierung der Gram-negativen Reinkulturen der Screening-Durchgänge 3 und 4 mittels BD BBL Enterotube II (rechts)	140
Tabelle 4.36: Stoffwechselphysiologische Identifizierung der Gram-positiven Reinkulturen – Test auf Substratverwertung durch die Isolate des Screening-Durchgänge 1 und 2, sowie den Typ-Stämmen <i>C. butyricum</i> DSMZ 10702 und <i>C. diolis</i> DSMZ 15410.....	141
Tabelle 4.37: Sicherheitseinstufung der isolierten Produktionsstämme der Screening-Durchgänge 1 bis 4 nach TRBA 466	142
Tabelle 4.38: Identifizierung des Stammes AKR17a (Screening 1) mittels 16S rDNA-Analyse	143
Tabelle 4.39: Identifizierung der Stämme AKR91b, AKR92a und AKR102a (Screening 2) mittels 16S rDNA-Analyse	143
Tabelle 4.40: Zusammenfassung Screening 1 bis 4 - Selektionskriterien, Inokulum, der Selektivität des Anreicherungsmedien und Optimierungsschritte	145
Tabelle 7.1: Liste der wichtigsten Chemikalien	155
Tabelle 7.2: Liste der wichtigsten Geräte	156
Tabelle 7.3: Liste spezieller Materialien und kommerzieller Testsysteme	157
Tabelle 7.4: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 1	158
Tabelle 7.5: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 2	158
Tabelle 7.6: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 3	158
Tabelle 7.7: Natürliche Proben - Screening-Durchgang 4	159

8 Literaturverzeichnis

- Abbad-Andaloussi S, Manginotdur C, Amine J, Petitdemange E, Petitdemange H (1995) Isolation and Characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 Mutants with Increased Resistance to 1,3-Propanediol and Altered Production of Acids. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4413-4417
- Agrimony.com (2011) High sugar prices 'fuelling drift to corn syrup':
<http://www.agrimoney.com/news/high-sugar-prices-fuelling-drift-to-corn-syrup---2882.html>
- Antranikian G und Schäfer T (2006) *Angewandte Mikrobiologie - Screening nach industriellen Enzymen*: 173-187, Springer, Berlin Heidelberg
- Appleby, D (2005) *The Biodiesel Handbook - Glycerol*, AOCS Publishing, Champaign, Illinois
- Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat) (2011) *Erneuerbare Energien 2010. Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit*:
http://www.bmu.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/ee_in_zahlen_2010_bf.pdf
- Barbirato F, Camarasaclaret C, Grivet JP, Bories A (1995) Glycerol Fermentation by A New 1,3-Propanediol-Producing Microorganism - *Enterobacter agglomerans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 786-793
- Barbirato F, Grivet JP, Soucaille P, Bories A (1996) 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1448-1451
- Barbirato F, Himmi EH, Conte T, Bories A (1998) 1,3-Propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products* 7: 281-289
- Bast E (2001) *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Bearson S, Bearson B, Foster JW (1997) Acid stress responses in enterobacteria. *Fems Microbiology Letters* 147: 173-180
- Beauprez JJ, De Mey M, Soetaert WK (2010) Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry* 45: 1103-1114
- Bechthold I, Bretz K, Kabasci S, Kopitzky R, Springer A (2008) Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources. *Chemical Engineering & Technology* 31: 647-654
- Bell BM, Briggs JR, Campbell RM, Chambers SM, Gaarenstroom PD, Hippler JG, Hook BD, Kearns K, Kenney JM, Kruper WJ, Schreck DJ, Theriault CN, Wolfe CP (2008) Glycerin as a renewable feedstock for epichlorohydrin production. The GTE process. *Clean-Soil Air Water* 36: 657-661
- Beyer H, Walter W, und Francke W (2004) *Lehrbuch der organischen Chemie*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart
- Biebl H (1991) Glycerol Fermentation of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* - Measurement of Product Inhibition by Use of a pH- Auxostat. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 701-705

- Biebl H, Marten S, Hippe H, Deckwer WD (1992) Glycerol Conversion to 1,3-Propanediol by Newly Isolated Clostridia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 592-597
- Biebl H und Sproer C (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp nov. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 491-497
- Blairon L, Maza ML, Wybo I, Piérard D, Dediste A, Vandenberg O (2010) Vitek 2 ANC card versus BBL Crystal Anaerobe and RapID ANA II for identification of clinical anaerobic bacteria. *Anaerobe* 16: 355-361
- Bock R (2004) Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Mikroorganismen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Bohon MD, Metzger BA, Linak WP, King CJ, Roberts WL (2011) Glycerol combustion and emissions. *Proceedings of the Combustion Institute* 33: 2717-2724
- Bonjoch X und Blanch A (2009) Resistance of Faecal Coliforms and Enterococci Populations in Sludge and Biosolids to Different Hygienisation Treatments. *Microbial Ecology* 57: 478-483
- Borenshtein D und Schauer D (2006) The Prokaryotes - The Genus *Citrobacter*. 90-98, Springer, New York
- Brisse S, Grimont F, und Grimont P (2006) The Prokaryotes - The Genus *Klebsiella*. 159-196, Springer, New York
- Brock TD, Madigan M, Martinko J, und Parker J (2000) Brock biology of microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey
- Bull AT, Goodfellow M, Slater JH (1992) Biodiversity As A Source of Innovation in Biotechnology. *Annual Review of Microbiology* 46: 219-252
- Bull AT, Ward AC, Goodfellow M (2000) Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 573-606
- Bundesumweltamt (2009) Coliforme Bakterien im Trinkwasser. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 52: 474-482
- Busse S (2010) Interdependencies between Rapeseed and Biodiesel in Europe - Empirical Results and Policy Implications. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen
- Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, Doulgeraki A, Nychas GJ, Zeng AP (2011) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 101-112
- Chen X, Zhang DJ, Qi WT, Gao SJ, Xiu ZL, Xu P (2003) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 143-146
- Cheng KK, Liu HJ, Liu DH (2005) Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. *Biotechnology Letters* 27: 19-22
- Choi W (2008) Glycerol-Based Biorefinery for Fuels and Chemicals. *Recent Patents on Biotechnology* 2: 173-180
- Circle SJ, Stone L, Boruff CS (1945) Acrolein Determination by Means of Tryptophane. A Colorimetric Micromethod. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 17: 259-262

Claisse O und Lonvaud-Funel A (2000) Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. Food Microbiology 17: 513-519

Clarkson K, Jones B, Bott R, Bower B, Chotani G, und Becker T (2000) Enzymes in farm animal nutrition - Enzymes: screening, expression, design and production: 315-352, CABI Publishing, Wallingford, UK

Colin T, Bories A, Moulin G (2000) Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 201-205

da Silva G, Mack M, Contiero J (2008) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnology Advances 27: 30-39

Daniel R, Boenigk R, Gottschalk G (1995) Purification of 1,3-Propanediol Dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and Cloning, Sequencing, and Overexpression of the Corresponding Gene in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 177: 2151-2156

Deckwer WD (1995) Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol. Fems Microbiology Reviews 16: 143-149

Deutsche Bundesregierung mit Zustimmung des Bundesrates (1990) Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung - GenTSV).

Deutsche Bundesregierung mit Zustimmung des Bundesrates (1999) Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung - BioStoffV).

Deutscher Bundestag mit Zustimmung des Bundesrates (1990) Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG).

Dhalluin A, Lemee L, Pestel-Caron M, Mory F, Leluan G, Lemeland JF, Pons JL (2003) Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (tpi) gene. Systematic and Applied Microbiology 26: 90-96

Droffner ML, Brinton Jr WF, Evans E (1995) Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50–70°C) composting environments. Biomass and Bioenergy 8: 191-195

DSMZ (2011) German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, List of Media.

Duetz WA (2007) Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. Trends in Microbiology 15: 469-475

Duetz WA und Witholt B (2001) Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. Biochemical Engineering Journal 7: 113-115

DuPont (2010a) DuPont Tate & Lyle Bio Products Expanding Bio-PDO™ Production in Tennessee:
http://us.vocuspr.com/Newsroom/Query.aspx?SiteName=DupontNew&Entity=PRAsset&SF_PRAsset_PRAssetID_EQ=106436&XSL=PressRelease&Cache=

DuPont (2010b) Growing Demand for DuPont Renewable Products Drives Global Commercialization:
http://us.vocuspr.com/Newsroom/Query.aspx?SiteName=DupontNew&Entity=PRAsset&SF_PRAsset_PRAssetID_EQ=113705&XSL=PressRelease&Cache=

DuPont (2006) DuPont Engineering Polymers Previews Plans to Produce a New Family of High-Performance Polymers Made with Renewable Resources:
http://www2.dupont.com/Automotive/en_US/news_events/article20060620c.html

Endres HJ und Siebert-Raths A (2009) Technische Biopolymere: Rahmenbedingungen, Marktsituation, Herstellung, Aufbau und Eigenschaften. Hanser Fachbuchverlag, München

Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union (2000) Richtlinie 2000/54/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit.

Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union (2003) Richtlinie 2003/30/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 8. Mai 2003 zur Förderung der Verwendung von Biokraftstoffen oder anderen erneuerbaren Kraftstoffen im Verkehrssektor.

FNR (2010) Biokraftstoffe Basisdaten:
http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/literatur/pdf_174-basisdaten_biokraftstoffe_v10.pdf

Forage RG und Foster MA (1982) Glycerol Fermentation in *Klebsiella pneumoniae* - Functions of the Coenzyme-B12-Dependent Glycerol and Diol Dehydratases. Journal of Bacteriology 149: 413-419

Forsberg CW (1987) Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and Other *Clostridium* Species. Applied and Environmental Microbiology 53: 639-643

Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P (1992) How Close Is Close - 16S Ribosomal-RNA Sequence Identity May Not be Sufficient to Guarantee Species Identity. International Journal of Systematic Bacteriology 42: 166-170

Francino M, Santos S, und Ochman H (2006) The Prokaryotes - Phylogenetic Relationships of Bacteria with Special Reference to Endosymbionts and Enteric Species: 41-59, Springer, New York

Freund A (1881) Über die Bildung und Darstellung von Trimethylenalkohol aus Glycerin. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft Berlin 10: 636-641

Gonzalez-Pajuelo M, Andrade JC, Vasconcelos I (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 31: 442-446

Grimont F und Grimont P (2006) The Prokaryotes - The Genus *Enterobacter*: 197-214, Springer, New York

Günzel B, Yonsel S, Deckwer WD (1991) Fermentative Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Clostridium butyricum* Up to a Scale of 2 m³. Applied Microbiology and Biotechnology 36: 289-294

Haas MJ, McAloon AJ, Yee WC, Foglia TA (2006) A process model to estimate biodiesel production costs. Bioresource Technology 97: 671-678

Haas T und Skerra A (2008) Weiße Biotechnologie – Innovation für die Chemieindustrie. Nachrichten aus der Chemie 56: 1028-1031

Hao J, Lin R, Zheng Z, Liu H, Liu D (2008a) Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. World Journal of Microbiology & Biotechnology 24: 1731-1740

Hao J, Lin RH, Zheng ZM, Sun Y, Liu DH (2008b) 3-Hydroxypropionaldehyde guided glycerol feeding strategy in aerobic 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 35: 1615-1624

Harding KG, Dennis JS, von Blottnitz H, Harrison STL (2008) A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. Journal of Cleaner Production 16: 1368-1378

Hirschmann S, Baganz K, Koschik I, Vorlop KD (2005) Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters. Landbauforschung Volkenrode 55: 261-267

Holdeman, LV, Moore WEC, und Cato EP (1977) Anaerobe laboratory manual. Blacksburg, Virginia

Homann T, Tag C, Biebl H, Deckwer WD, Schink B (1990) Fermentation of Glycerol to 1,3-Propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* Strains. Applied Microbiology and Biotechnology 33: 121-126

ICIS (2009) Shell's PTT Poly Canada venture to close down:
<http://www.icis.com/Articles/2009/03/03/9197225/shells-ptt-poly-canada-venture-to-close-down.html>

Janda JM und Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology 45: 2761-2764

Janda JM und Abbott SL (2002) Bacterial identification for publication: When is enough enough? Journal of Clinical Microbiology 40: 1887-1891

Janda JM und Abbott SL (2006) The enterobacteria. ASM Press, Washington

Johnson DT und Taconi KA (2007) The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. Environmental Progress 26: 338-348

Jun SA, Moon C, Kang CH, Kong SW, Sang BI, Um Y (2009) Microbial Fed-batch Production of 1,3-Propanediol Using Raw Glycerol with Suspended and Immobilized *Klebsiella pneumoniae*. Applied Biochemistry and Biotechnology 161: 491-501

Kawasaki S, Nakagawa T, Nishiyama Y, Benno Y, Uchimura T, Komagata K, Kozaki M, Niimura Y (1998) Effect of oxygen on the growth of *Clostridium butyricum* (type species of the genus *Clostridium*), and the distribution of enzymes for oxygen and for active oxygen species in Clostridia. Journal of Fermentation and Bioengineering 86: 368-372

Kotrba R (2007) The Glycerin Spread. Biodiesel Magazine:
<http://www.biodieselmagazine.com/articles/1797/the-glycerin-spread>

Kraus GA (2008) Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. Clean-Soil Air Water 36: 648-651

Krauter H, Willke T, Vorlop KD (2012) Production of high amounts of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* with strongly increased biocatalyst lifetime and productivity. New Biotechnology 29: 211-217

Kurian JV (2005) A new polymer platform for the future - Sorona (R) from corn derived 1,3-propanediol. Journal of Polymers and the Environment 13: 159-167

Lancrenon X und Fedders J (2008) An Innovation in Glycerin Purification. Biodiesel Magazine:
<http://www.biodieselmagazine.com/articles/2388/an-innovation-in-glycerin-purification/>

Lelieveld H, Bachmayer H, Boon B, Brunius G, Bürki K, Chmiel A, Collins C, Crooy P, Doblhoff-Dier O, Economidis I, Elmqvist A, Frommer W, Frontali-Botti C, Havenaar R, Haymerle H, Hussey C, Käppeli O, Lex M, Lund S, Mahler J, Marris R, Mosgaard C, Normand-Plessier C, Rudan F, Simon R, Logtenberg M, Werner R (1995) Safe biotechnology. Part 6. Safety assessment, in respect of human health, of microorganisms used in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 389-393

Leung DY, Wu X, Leung MKH (2010) A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy* 87: 1083-1095

Li M (2011) Bericht: Peak Energy and the Limits to Global Economic Growth-Annual Report 2011.

Lide DR (2004) CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data. CRC Press, Boca Raton, Florida

Lindstrom MK, Jankola HM, Hielm S, Hyytiä EK, Korkeala HJ (1999) Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24: 267-274

Liu HJ, Xu YZ, Zheng ZM, Liu DH (2010a) 1,3-Propanediol and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal* 5: 1137-1148

Liu HJ, Zhang DJ, Xu YH, Mu Y, Sun YQ, Xiu ZL (2007) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnology Letters* 29: 1281-1285

Liu H, Ou X, Zhou S, und Liu D (2010b) *Plastics from Bacteria - Microbial 1,3-Propanediol, Its Copolymerization with Terephthalate, and Applications*: 405-425, Springer, Berlin / Heidelberg

Luthi-Peng Q, Dileme FB, Puhan Z (2002) Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 289-296

Macy JM, Snellen JE, Hungate RE (1972) Use of Syringe Methods for Anaerobiosis. *American Journal of Clinical Nutrition* 25: 1318-1323

Mantzouridou F, Naziri E, Tsimidou MZ (2008) Industrial Glycerol as a Supplementary Carbon Source in the Production of β -Carotene by *Blakeslea trispora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2668-2675

Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD (1997) High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol* 20: 82-86

Metabolic Explorer (2010) METabolic EXplorer expands into South East Asia, with the set-up of its first PDO manufacturing plant in Bio-XCell, Malaysia:
<http://www.actusnews.com/communique.php?ID=ACTUS-0-21675>

Mignard S und Flandrois JP (2006) 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* 67: 574-581

Mitchell, WJ (2001) *General Biology and Physiology*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

- Moon C, Ahn JH, Kim SW, Sang BI, Um Y (2009) Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161: 502-510
- Mory F, Alauzet C, Matuszeswski C, Riegel P, Lozniewski A (2009) Evaluation of the New Vitek 2 ANC Card for Identification of Medically Relevant Anaerobic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 1923-1926
- Mu Y, Teng H, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnology Letters* 28: 1755-1759
- Nakamura CE und Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 454-459
- Neilson AH und Sparell L (1976) Acetylene-Reduction (Nitrogen-Fixation) by *Enterobacteriaceae* Isolated from Paper-Mill Process Waters. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 197-205
- Nielsen PM, Brask J, Fjerbaek L (2008) Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110: 692-700
- Nilles D (2006) Combating the glycerol glut. *Biodiesel Magazine*: <http://biodieselmagazine.com/articles/1123/combating-the-glycerin-glut/>
- Nolte S und Grethe H (2011) Der Markt für Zucker. *German Journal of agricultural economics* Volume 60: 37-51
- O'Hara CM (2005) Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 147-162
- Oppenberg B und Schink B (1990) Anaerobic Degradation of 1,3-Propanediol by Sulfate-Reducing and by Fermenting Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 57: 205-213
- Otte B, Grunwaldt E, Mahmoud O, Jennewein S (2009) Genome shuffling of *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3-propanediol production. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7610-7616
- Overmann J (2006) *The Prokaryotes - Principles of Enrichment, Isolation, Cultivation and Preservation of Prokaryotes*: 80-136, Springer, New York
- Pagliaro M und Rossi M (2010) *Future of Glycerol*. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Pagliaro M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, la Pina C (2009) Recent advances in the conversion of bioglycerol into value-added products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 788-799
- Papanikolaou S, Fakas S, Fick M, Chevalot I, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Marc I, Aggelis G (2008) Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy* 32: 60-71
- Papanikolaou S, Fick M, Aggelis G (2004) The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79: 1189-1196

- Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, Blanchard F, Fick M (2000) High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology* 77: 191-208
- Patel JB (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis* 6: 313-321
- Patel M, Crank M, Dornburg V, Hermann B, Roes L, Hüsing B, Overbeek L, Terragni F, and Recchia E (2006) Bericht: Medium and Long-term Opportunities and Risks of the Biotechnological Production of Bulk Chemicals from Renewable Resources - The Potential of White Biotechnology. The BREW Project. Final Report Prepared under the European Commission's GROWTH Programme. Universität Utrecht
- Petitdemange E, Durr C, Andaloussi SA, Raval G (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology* 15: 498-502
- Petrova P, Petrov K, Beschkov V (2009) Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by Newly Isolated Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* 62: 233-242
- Pflugmacher U und Gottschalk G (1994) Development of An Immobilized Cell Reactor for the Production of 1,3-Propanediol by *Citrobacter freundii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 313-316
- Pinto MG, Pasteris SE, de Saad AMS (2004) Glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from beer. *Food Microbiology* 21: 111-118
- Podschun R und Ullmann U (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 589-603
- Pourshaban M, Franciosa G, Fenicia L, Aureli P (2002) Taxonomic identity of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains by sequencing of a short 16S rDNA region. *FEMS Microbiology Letters* 214: 119-125
- Pyle DJ, Garcia RA, Wen Z (2008) Producing Docosaheptaenoic Acid (DHA)-Rich Algae from Biodiesel-Derived Crude Glycerol: Effects of Impurities on DHA Production and Algal Biomass Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3933-3939
- Rainey FA, WardRainey N, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E (1996) The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: Proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 1088-1092
- Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles I, Croux C, Soucaille P (2003) Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5010-5015
- Rehman A, Saman WRG, Nomura N, Sato S, Matsumura M (2008) Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 1072-1080

Reimann A, Abbad-Andaloussi S, Biebl H, Petitdemange H (1998) 1,3-propanediol formation with product-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow (vol 84, pg 1125, 1998). Journal of Applied Microbiology 85: 1079-1079

Retka Schill S (2010) Global biodiesel demand to double in 5 years. Biodiesel Magazine: <http://www.biodieselmagazine.com/articles/3983/global-biodiesel-demand-to-double-in-5-years>

Rhein HB, Endler K, Ulber R, Muffler K, und Müller F (2011) Bericht: Anreize für die Entwicklung und Anwendung umweltfreundlicher biotechnischer Produkte und Verfahren. Bundesumweltamt

Roa Engel C, Straathof A, Zijlmans T, van Gulik W, van der Wielen L (2008) Fumaric acid production by fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 78: 379-389

Saint-Amans S, Girbal L, Andrade J, Ahrens K, Soucaille P (2001) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. Journal of Bacteriology 183: 1748-1754

Sattayasamitsathit S, Prasertsan P, Methacanon P (2011) Statistical optimization for simultaneous production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. Process Biochemistry 46: 608-614

Sauer M, Marx H, Mattanovich D (2008) Microbial Production of 1,3-Propanediol. Recent Patents on Biotechnology 2: 191-197

Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. Biotechnology Advances 27: 895-913

Scheer M (2010) Charakterisierung der Diversität von Mikroorganismen im Nationalpark "Unteres Odertal". Dissertation, Technische Universität Dresden

Schlegel HG und Zaborosch C (1992) Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart

Schutz H und Radler F (1984b) Propanediol-1,2-Dehydratase and Metabolism of Glycerol of *Lactobacillus-Brevis*. Archives of Microbiology 139: 366-370

Schutz H und Radler F (1984a) Anaerobic Reduction of Glycerol to Propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. Systematic and Applied Microbiology 5: 169-178

Sdrula N (2010) A study using classical or membrane separation in the biodiesel process. Desalination 250: 1070-1072

Seyfried M, Lyon D, Rainey FA, Wiegel J (2002) *Caloramator viterbensis* sp. nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1177-1184

Shen L, Haufe JI, und Patel MK (2009) Bericht: Product overview and market projection of emerging bio-based plastics, PRO-BIP 2009 : final report. European Bioplastics, Group Science, Technology and Society, Utrecht, the Netherlands

Singh SB und Pelaez F (2008) Natural Compounds as Drugs Volume I - Biodiversity, chemical diversity and drug discovery: 141-174, Birkhäuser Verlag, Basel

- Song H, Lee JW, Choi S, You JK, Hong WH, Lee SY (2007) Effects of dissolved CO₂ levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production. *Biotechnology and Bioengineering* 98: 1296-1304
- Sperner B, Eisgruber H, Stolle A (1999) Use of the RAPID ID 32 A(R) system for rapid identification of *Clostridium* species important in food hygiene. *International Journal of Food Microbiology* 52: 169-180
- Stackebrandt E und Goebel BM (1994) A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S Ribosomal-RNA Sequence-Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849
- Steele DB und Stowers MD (1991) Techniques for Selection of Industrially Important Microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 45: 89-106
- Steverding D (2010) Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. *Chemie in unserer Zeit* 44: 384-389
- Tag C (1990) Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Dissertation, Universität Oldenburg
- Tayler P (2008) Synthetic glycerine is back (but never really went away)!: <http://www.in-pharmatechnologist.com/Materials-Formulation/Synthetic-glycerine-is-back-but-never-really-went-away-!>
- Tindall BJ, Rossello-Mora R, Busse HJ, Ludwig W, Kampfer P (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 249-266
- Trösch W, Hirth T, Rupp S (2009) Bereitstellung von Energie und Rohstoffen für eine den biogenen Stoffkreisläufen nachempfundene, nachhaltige Stoffwirtschaft – Eine neue Herausforderung für die Bioverfahrenstechnik? *Chemie Ingenieur Technik* 81: 1697-1709
- Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, Itävaara M (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183
- UFOP (2009) Einsatz von Glycerin in der Fütterung. Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.(UFOP): http://www.ufop.de/downloads/Ufop-PI-Gly_2009_download.pdf
- UFOP (2010) Biodiesel 2009/2010 Sachstandsbericht und Perspektive – Auszug aus dem UFOP-Jahresbericht: http://www.ufop.de/downloads/RZ_UFOP_0879_netz_DE.pdf
- UFOP (2011a) Inlandsverbrauch Biokraftstoffe 2010. Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.(UFOP): <http://www.ufop.de/1299.php>
- UFOP (2011b) UFOP-Marktinformation Ölsaaten und Biokraftstoffe. (http://www.ufop.de/downloads/RZ_MI_0411.pdf)
- Uhlmann D und Horn W (2006) Ökologie von Stauseen. Lebensräume, Organismen, Raum-Zeit-Strukturen. *Biologie in unserer Zeit* 36: 92-101
- Valdivieso M (2010) MicroBiOil: From Crude Glycerin to Biodiesel. *Biodiesel Magazine*: <http://biodieselmagazine.com/articles/4205/microbioil-from-crude-glycerin-to-biodiesel>

- Vasudevan PT, Gagnon MD und Briggs MS (2010) Sustainable Biotechnology - Environmentally Sustainable Biofuels – The Case for Biodiesel, Biobutanol and Cellulosic Ethanol: 43-62, Springer, Netherlands
- Wang XM, Maegawa T, Karasawa T, Kozaki S, Tsukamoto K, Gyobu Y, Yamakawa K, Oguma K, Sakaguchi Y, Nakamura S (2000) Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. Applied and Environmental Microbiology 66: 4992-4997
- Werkman CH und Gillen GF (1932) Bacteria Producing Trimethylene Glycol. Journal of Bacteriology 23: 167-182
- Werpy T, Holladay J und White J (2004) Bericht: Top Value Added Chemicals From Biomass: I. Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. US Department of Energy
- Wiegel J, Tanner R und Rainey F (2006) The Prokaryotes - An Introduction to the Family *Clostridiaceae*: 654-678, Springer, New York
- Wilkens E (2012) Medienoptimierung zur Kostenreduktion der mikrobiellen Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Wilkens E, Ringel A, Hortig D, Willke T, Vorlop KD (2011) High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. Applied Microbiology and Biotechnology 93: 1057-1063
- Willke T und Vorlop K (2008) Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. European Journal of Lipid Science and Technology 110: 831-840
- Wittlich, P (2001) Biotechnologische Herstellung von 1,3-Propandiol mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* NRRL 1024 und thermophilen Mikroorganismen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Wittlich P, Themann A, Vorlop KD (2001) Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a newly isolated thermophilic strain. Biotechnology Letters 23: 463-466
- Wong CL, Huang CC, Chen WM, Chang JS (2011) Converting crude glycerol to 1,3-propanediol using resting and immobilized *Klebsiella* sp. HE-2 cells. Biochemical Engineering Journal 58-59: 177-183
- Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, Ou XJ, Liu HJ, Liu DH (2009a) Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. Biotechnology and Bioengineering 104: 965-972
- Xu YZ, Liu HJ, Du W, Sun Y, Ou XJ, Liu DH (2009b) Integrated production for biodiesel and 1,3-propanediol with lipase-catalyzed transesterification and fermentation. Biotechnology Letters 31: 1335-1341
- Yang G, Tian JS, Li JL (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 73: 1017-1024
- Yazdani SS und Gonzalez R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Current Opinion in Biotechnology 18: 213-219
- Yuste AJ und Dorado MP (2006) A neural network approach to simulate biodiesel production from waste olive oil. Energy & Fuels 20: 399-402

Zeng AP (1996) Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. Bioprocess Engineering 14: 169-175

Zeng AP und Biebl H (2002) Bulk Chemicals from Biotechnology: the case of 1,3-Propanediol production and new trends. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology 74: 239-259

Zeng AP, Biebl H, Schlieker H, Deckwer WD (1993) Pathway Analysis of Glycerol Fermentation by *Klebsiella-Pneumoniae* - Regulation of Reducing Equivalent Balance and Product Formation. Enzyme and Microbial Technology 15: 770-779

Zeng AP, Ross A, Biebl H, Tag C, Günzel B, Deckwer WD (1994) Multiple Product Inhibition and Growth Modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in Glycerol Fermentation. Biotechnology and Bioengineering 44: 902-911

Zhang GL, Ma BB, Xu XL, Li C, Wang LW (2007a) Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. Biochemical Engineering Journal 37: 256-260

Zhang ZY, Jin B, Kelly JM (2007b) Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. Biochemical Engineering Journal 35: 251-263

Zhou CHC, Beltramini JN, Fan YX, Lu GQM (2008) Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. Chemical Society Reviews 37: 527-549

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Sein Interesse am Fortschritt meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine guten Ideen waren ein wichtiger Grundstein dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Willke für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Er stand mir mit wertvollen, fachlichen Ratschlägen stets zur Seite und unterstützte mich unter großem zeitlichem Aufwand in meiner Arbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Diana Hortig und Herrn Dr. Erik Wilkens für die Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im IG-Biotech Projekt. Frau Hortig hat durch ihre engagierte Mitarbeit und organisierte Arbeitsweise im Labor wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Herrn Dr. Wilkens danke ich für seinen Rat und zahlreiche ergiebige Diskussionen.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Agrartechnologie und Biosystemtechnik des Johann Heinrich von Thünen-Instituts für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Claudia Wilkens, Frau Dr. Susann Baumert, Frau Dipl.-Biotechnol. Katrin Riedmann und Herrn Dr. Hendrik Krauter.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes IG-Biotech (FKZ 0315026E) bedanke ich mich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Frau Dr. Katrin Dohnt danke ich für ihren wissenschaftlichen Rat, ihre Freundschaft und die wertvollen Vorschläge zur Verbesserung des Manuskripts.

Ich danke Herrn M.Eng. Andreas Grün für seine Unterstützung, sein Verständnis und seine Geduld.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt hat. Vor allem meine Mutter hat mir die Kraft gegeben, an meinen Erfolg zu glauben und mich für meine Wünsche einzusetzen.